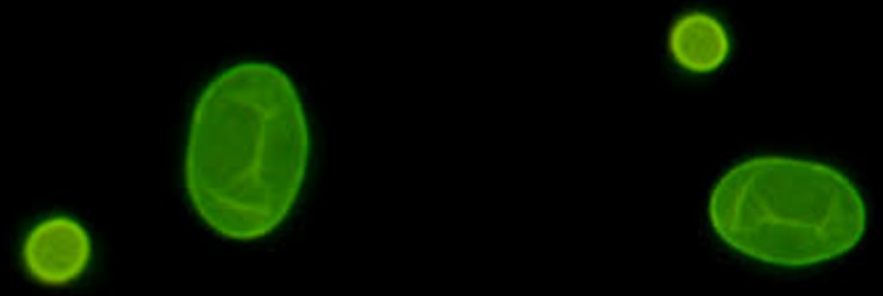
«Applicazione del metodo ISO 15553:2006 per la ricerca e la quantificazione di cisti di *Giardia* e oocisti di *Cryptosporidium* nell'ambiente idrico: criticità e approcci metodologici alternativi»



Rossella Briancesco
Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento Ambiente e Salute

Corso di formazione: «SORVEGLIANZA DEI PROTOZOI EMERGENTI NELL'ACQUA»
17 settembre 2021, AUSL Modena

Ridotta concentrazione di oo/cisti nelle acque

Basse dosi infettanti

Presenza discontinua nelle acque

Mancanza di metodi di arricchimento

Necessità di analizzare grandi volumi di acqua

Concentrazione

- filtrazione
- centrifugazione
- flocculazione

Selezione degli organismi target (purificazione)

Identificazione ed enumerazione

requisiti indispensabili: sensibilità, rapidità

VOLUME DI ACQUA DA ANALIZZARE

Acque di rete o di falda: 100 - 1000 L

Acque superficiali: 50 - 500 L

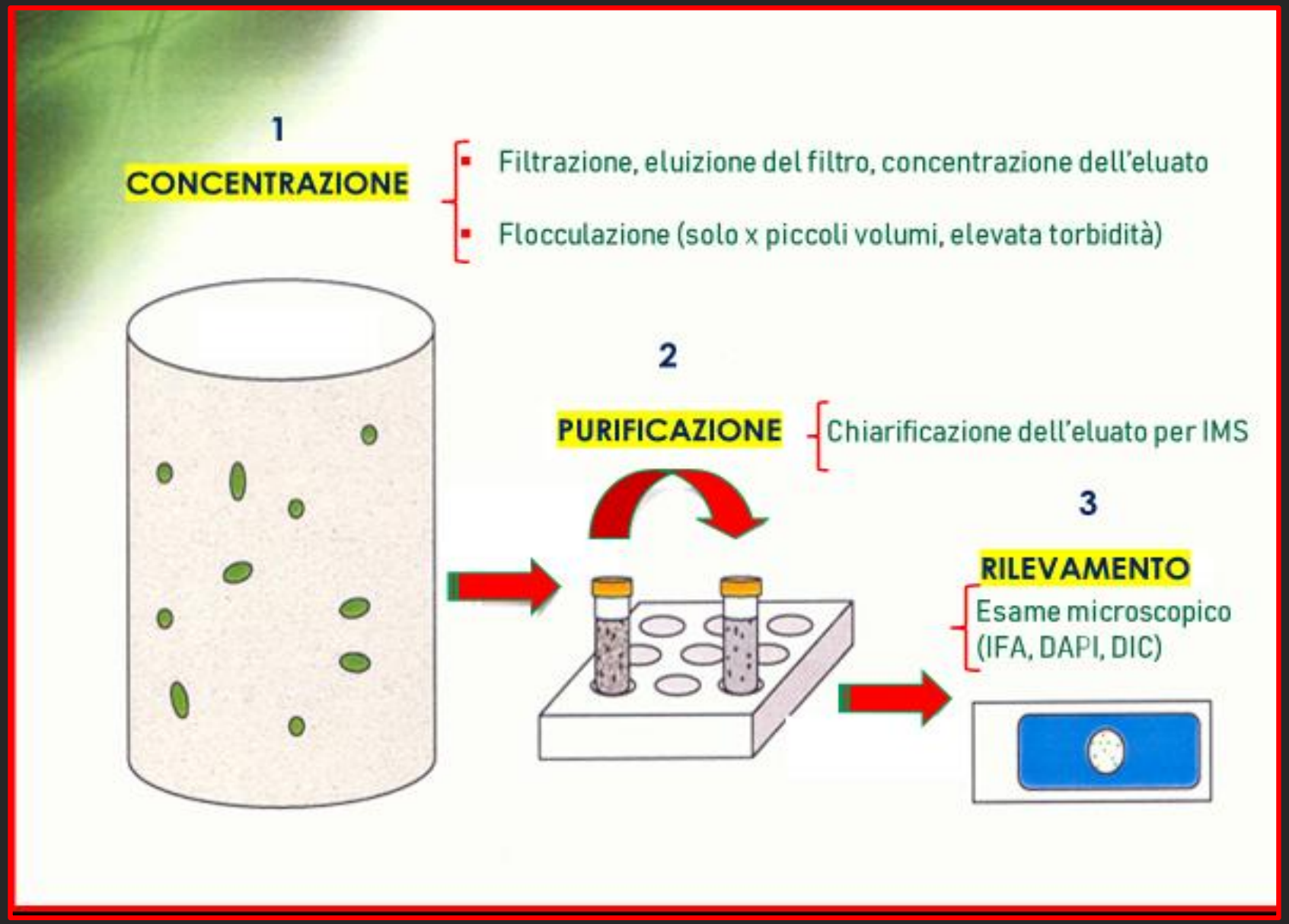
Acque grezze: 2 - 20 L

ISO 15553:2006 Water quality – Isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water

EPA Method 1623.1:2012 *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA

EPA Method 1693:2014 Cryptosporidium and Giardia in Disinfected Wastewater by Concentration/IMS/IFA

Metodi ufficiali


1
CONCENTRAZIONE
Filtrazione, eluizione del filtro, concentrazione dell'eluato
Flocculazione (solo x piccoli volumi, elevata torbidità)
2
PURIFICAZIONE
Chiarificazione dell'eluato per IMS
3
RILEVAMENTO
Esame microscopico
(IFA, DAPI, DIC)

Campo di applicazione:

ISO 15553:2006

- Acque superficiali
- Acque profonde
- Acque trattate
- Acque minerali
- Acque di piscina e adibite a scopi ricreazionali

Matrici analizzate da ISS-DAMSA

acque superficiali (fiume, lago) V: 50 - 100 L
acque di sorgente e di pozzo: 100 – 500 L
acque di rete: 300 – 500 L
acque di piscina: 100 – 500 L
effluenti secondari trattati (UV, peracetico, cloro): 50 L
effluenti secondari fitodepurati: 2 - 3 L
acque reflue: 1 - 2 L

Altre matrici analizzate da ISS DAMSA

(fase di concentrazione modificata)

- **Effluenti zootecnici**: centrifugazione/ IMS/ IFA (0,5 – 1 L)
- **Acque controlavaggio filtri piscina:** centrifugazione/ IMS/ IFA (1 – 1,5 L)
- **Suolo:** agitazione in tampone eluente/ pre-filtrazione grossolana/ centrifugazione/ IMS / IFA) (5 g)
- **Piante**: agitazione in tampone eluente/ centrifugazione/ IMS/ IFA (60 g)
- **Compost:** agitazione in tampone eluente/ pre-filtrazione grossolana/ centrifugazione/ flottazione/IFA (5 g)

ISO 15553:2006

Concentrazione *in loco* (o in lab per volumi trasportabili) di un volume noto di acqua mediante filtrazione attraverso filtri a capsula (Pall Envirochek)
o moduli filtranti di schiuma compressa Filta-Max (IDEXX)

Sistema di filtrazione	Volume (L)
Pall Envirochek ™ STD	10 – 200
Pall Envirochek ™ HV	10 - 1000
IDEXX Filta-Max ®	10 - 1000

FILTRAZIONE

ISO 15553:2006

Pall Envirochek™ HV

Filtro a capsula: membrana di poliestere ripiegata a soffietto e compressa su supporto di polipropilene, racchiusa in capsula di policarbonato

- Porosità: 1 µm
- Flusso max: 3,4 L/min
- Pressione max: 4,1 bar
- Volume filtrabile: 10 – 1000 L

IDEXX Filta-Max®

Modulo filtrante: filtro costituito da 60 dischi di *compressed foam* compressi tra due piastre e posto in una camera di alloggiamento

- Porosità: 1µm
- Flusso max: 5 L/min
- Pressione max: 8 bar
- Volume filtrabile: 10 - 1000 L

Punti critici

FILTRAZIONE

Non superare i limiti di flusso consigliati

Rischi ⟹ **- L'acqua bypassa il filtro**

⇓

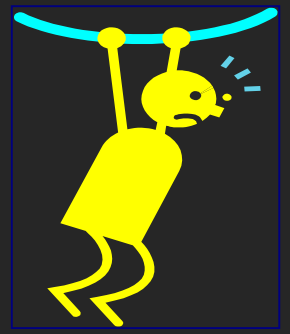
Ridotta efficienza di recupero

- Le cisti/oocisti sono danneggiate

⇓

Difficoltà nel riconoscimento

Punti critici



Trasporto e refrigerazione

Completato il campionamento, trasportare i filtri in laboratorio in borsa refrigerata o a temperatura ambiente, mantenendoli al buio.

Conservare i filtri a 4 °C se non immediatamente eluiti

I filtri dovrebbero essere eluiti quanto prima possibile, preferibilmente entro 24 ore dal campionamento e mai oltre il quarto giorno.

Il materiale spugnoso rimane compresso

ELUIZIONE DEI FILTRI

ISO 15553:2006

Sistema Pall Envirochek

lavaggi del filtro a capsula in un tampone di eluizione contenente un tensioattivo (laureth) e agitazione meccanica mediante agitatore a braccetti

Sistema IDEXX Filta-Max

nella stazione di lavaggio manuale il modulo filtrante è immerso nel tampone eluente e i dischi subiscono ripetuti movimenti meccanici di compressione e decompressione

oppure:

nella stazione di eluizione a pressione un tampone di eluizione contenente Tween 20 è forzato ad attraversare i dischi di schiuma del modulo filtrante

CONCENTRAZIONE DELL'ELUATO

ISO/CD 15553:2006

Sistema Pall Envirochek

- **Centrifugazione**

Sistema Filta-Max eluizione manuale

- filtrazione attraverso membrane di nitrato di cellulosa (porosità 3 µm) utilizzando pompa da vuoto.

- Eluizione membrane per sfregamento manuale in bustine di nylon contenenti tampone di eluizione

- **Centrifugazione** (se necessaria)

Sistema Filta-Max xpress eluizione a pressione

- **Centrifugazione**

Centrifugazione

Punti critici

ISO 15553:2006

- Attenzione a non creare vortici e turbolenze, aspirare lentamente il surnatante aspirando dalla superficie del liquido
- Con un passaggio in centrifuga si può perdere fino al 40% del target
- Il recupero è influenzato dal volume e dalla forma del recipiente

1 L fondo piatto → 32±5% **50-250 mL fondo conico → 89±9%**

I tubi utilizzati devono essere conici e il rotore a braccio oscillante

Concentrazione sotto vuoto (sistema IDEXX manuale)

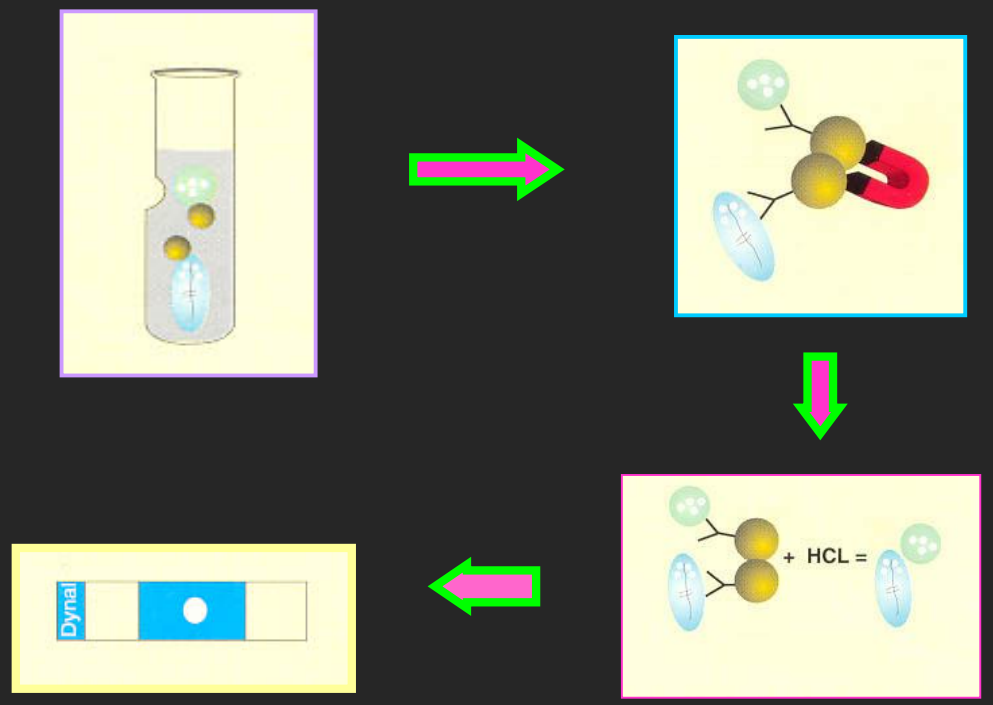
Nell'aspirazione sotto vuoto della fase liquida non superare la pressione di 30 cm Hg

Deformazione di cisti ed oocisti, difficoltà nel riconoscimento microscopico

PURIFICAZIONE

CHIARIFICAZIONE PER SEPARAZIONE IMMUNOMAGNETICA (IMS)

Cisti di *Giardia* e oocisti di *Cryposporidium* isolate da campioni concentrati di acqua mediante utilizzo di microsfere magnetiche coniugate con anticorpi anti-cisti di *Giardia* e anti-oocisti di *Cryptosporidium* (Dynal)



ISO 15553:2006

EPA Method 1623.1:2012

EPA Method 1693:2014

IMS: vantaggi

- **separazione specifica** (tecnica molto valida per incrementare la sensibilità del metodo di ricerca in acque con scarsa o media concentrazione di cisti/oocisti ed elevata torbidità come in acque di superficie e reflue)

- **buona efficienza di recupero**

  tra 62 e 100% (Invitrogen)

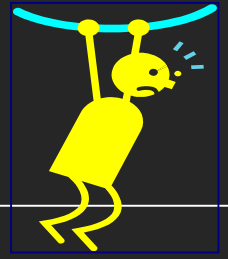
  78,6% *Giardia*
  69,3% *Cryptosporidium* (Hsu *et al.* 2000)

- **facile esame microscopico della sospensione finale**

IMS: criticità

- Non consente l'identificazione a livello di specie o di genotipo dei microrganismi isolati
- Non consente di valutare l'infettività
- L'applicazione della metodica richiede tempo
- Il costo dei kit è elevato

IMS



Punti critici

!! Non superare il volume di pellet indicato (0,5 mL) per 10 mL di campione da chiarificare

Perdita efficienza di recupero

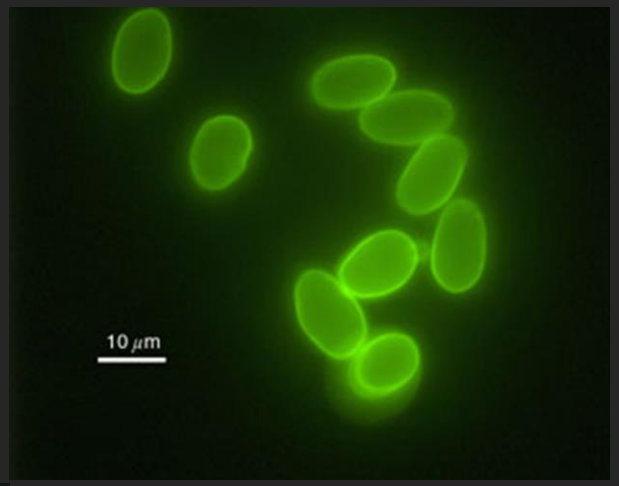
E' opportuno chiarificare e quindi sottoporre ad esame microscopico tutto il volume di campione ottenuto dopo concentrazione

Se presenti sedimenti ferrosi questi possono essere rimossi esponendo all'azione dei magneti prima di aggiungere i reattivi dell'IFA

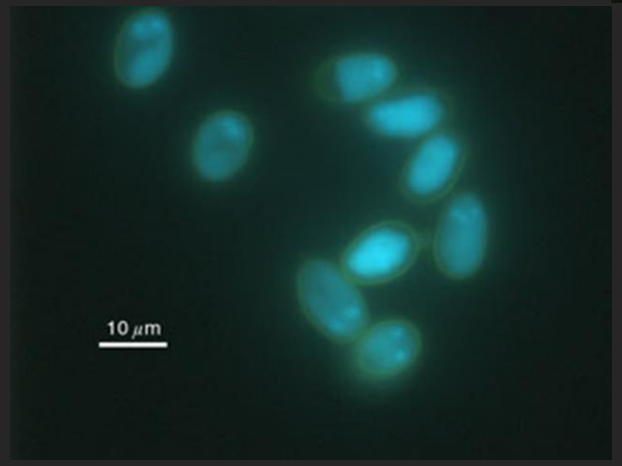
ESAME MICROSCOPICO

★ **Immunofluorescenza (IFA)**

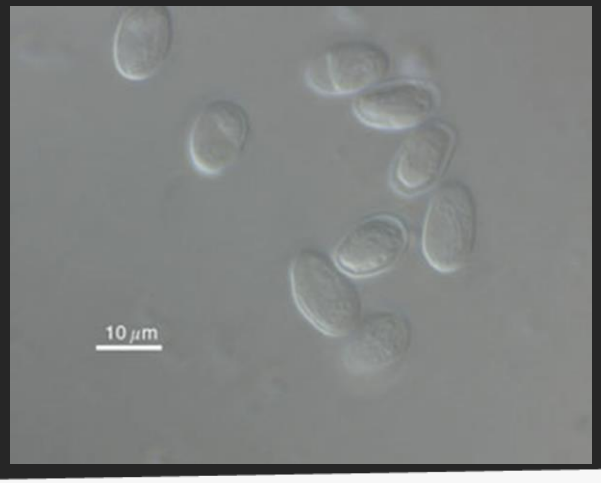
Utilizzo di anticorpi monoclonali anti-*Cryptosporidium* e anti-*Giardia* coniugati con un fluorocromo (FITC)
(Meridian, Shield, Cellabs, Did, Ensys Inc.)



★ **Colorazione con DAPI**

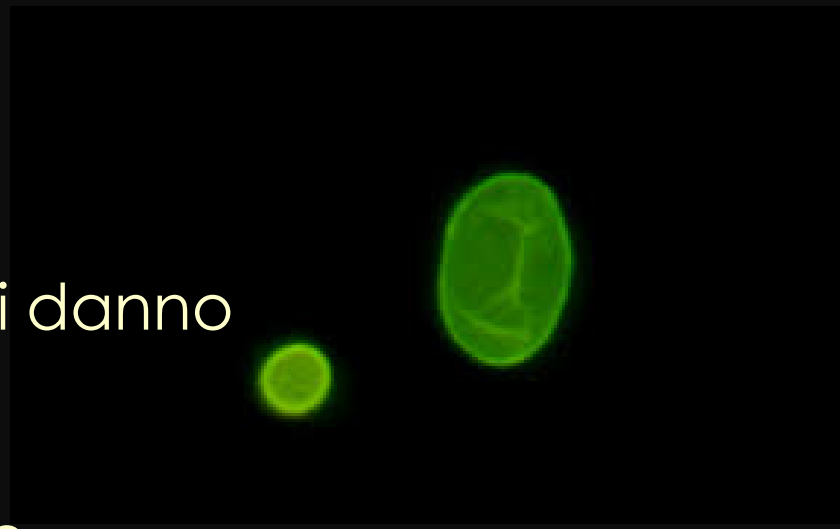


★ **Microscopia a contrasto di interferenza differenziale (DIC)**



Immunofluorescenza

- Elevata sensibilità e specificità (96–100%)
- Consente determinazione quantitativa



Limiti

- Alghe e lieviti presenti nei campioni ambientali danno luogo a fenomeni di fluorescenza aspecifica

- I kit disponibili in commercio non sono in grado di discriminare a livello di specie e di genotipo

- Non è possibile trarre informazioni sulla vitalità ed infettività delle cisti/oocisti

Procedure per il controllo di qualità

ISO15553:2006

Ad intervalli regolari (un campione ogni 20 analizzati e comunque almeno uno al mese) occorre effettuare il controllo di qualità sull'intera procedura di concentrazione e di analisi.

Standards a titolo noto:

Easy Seed BTF (Biopoint) (Avantor_VWR)

Color Seed (Biopoint) x controllo interno

www.tcswatersciences.co.uk/easyseed.htm

Waterborne Inc

www.waterborneinc.com

EFFICIENZA DI RECUPERO

VARIABILE

Influenzata da:

- torbidità dell'acqua
- natura del particolato
- manualità dell'operatore
- numero di cisti/oocisti presenti
- materiale filtro, tampone eluizione

Recupero

Cryptosporidium

(1040 – 3600 oocisti)

Sistema Filtamax

(senza procedure di chiarificazione)

Sartory et al. 1998

Acqua di rubinetto (100-2000 L)	90,2% (76,7 – 106,7%)
Acqua di fiume (10 – 20L)	88,8% (76,9-97,2%)

Sistema Envirochek HV

(studi di validazione con IMS)

Acqua di rubinetto (1000 L)	60,4 - 68,8 %

«It is impracticable to give guidance on the percentage recovery tha should be achieved. Each water type may give different recovery value» (ISO 15553:2006)

EFFICIENZA DI RECUPERO

Cryptosporidium

Volume acqua: 10 L
Torbidità: 0,15 NTU (potabili)10 NTU (sorgive)
Dose seminata: 1000 oocisti

Filtro	Acqua	Recupero medio% ± SD
Filta-Max	di sorgente	81,3 ± 7,6
	potabilizzata	74,2 ± 9,4
Envirocheck HV	di sorgente	68,2 ± 13,2
	potabilizzata	62,5 ± 16,8

Lee *et al.*, 2004

Filta-Max xpress studi di validazione

Prove effettuate su 10 litri di acqua non trattate
Dose seminata: 100 oocisti/cisti

	Cryptosporidium		*Giardia*	
	Recupero medio %	SD	Recupero medio %	SD
Lab 1 (8 campioni)	56,6	14,2	48,8	22,8
Lab 2 (8 campioni)	43,3	18,5	48	16,8

I metodi ufficiali non danno informazioni su:

- appartenenza a specie
- genotipo
- vitalità cisti/oocisti
- infettività

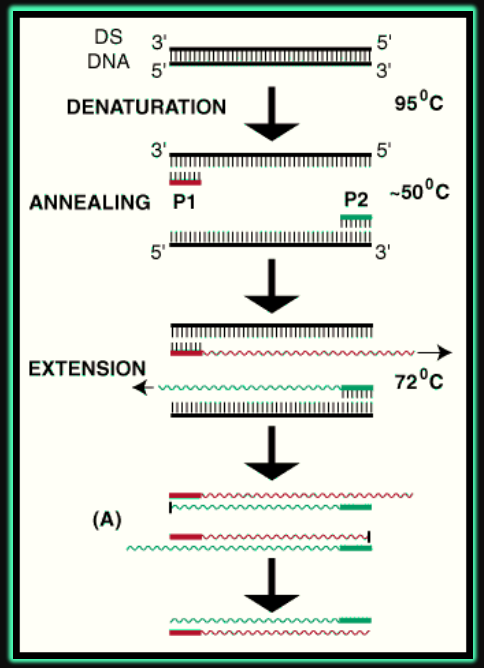
A supporto varie tecniche ancora non standardizzate

Tecniche molecolari

PCR convenzionale: Verifica della presenza di DNA specifico per *C* e *G*

- Estrazione del DNA (cicli di congelamento/ scongelamento) e purificazione
- Amplificazione in presenza di primers specifici
- Visualizzazione degli amplificati su gel di agarosio
- Conferma amplificati per sequenziamento genico

Crypto: geni rRNA SSU, COWP, 70 kDa heat shock protein (HSP70), 18S rRNA, 60 kDa glycoprotein gene (gp60)
Giardia: gene ß giardin



Nested PCR : ulteriore amplificazione che utilizza primer interni alla sequenza amplificata

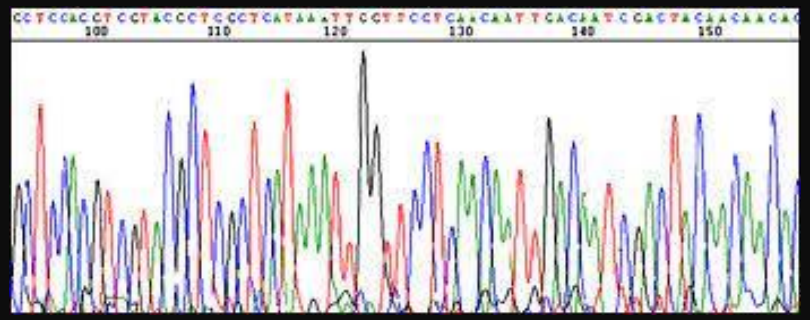
Vantaggi

- Elevata sensibilità
- Elevata specificità
- Rapido screening

Limiti

- Necessità di concentrati purificati (acidi umici, fulvici e cationi bivalenti: inibitori)
- Metodica non quantitativa, necessità integrare con IFA
- Non fornisce informazioni sulla vitalità

Sequenziamento genico



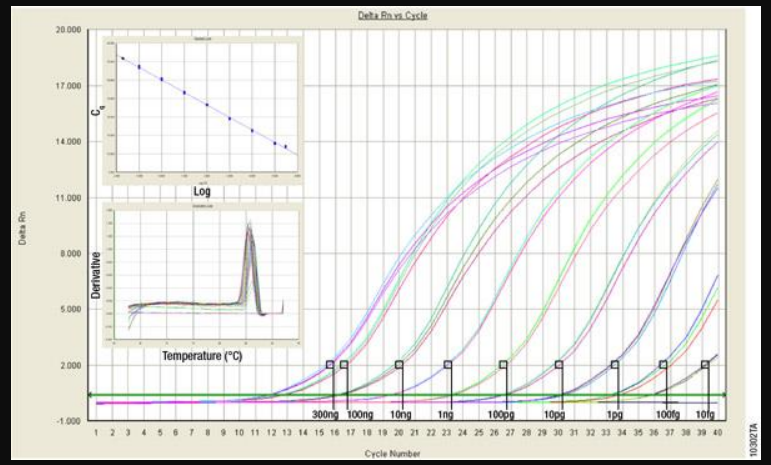
- Valutazione delle variazioni genomiche intra e inter-specifiche

  geni rRNA SSU: classificazione di 34 specie e 40 genotipi di Cryptosporidium
  gene gp60: screening dei sottogenotipi di C. parvum e C. hominis

- Ha sostituito la **PCR-RFLP o** analisi del polimorfismo di restrizione

Metodica lunga, articolata, richiede manualità. Facilmente eseguibile da ditte esterne specializzate.

Real Time qPCR: Identificazione e quantificazione rapida delle specie di protozoi



Utilizzata in campioni ambientali
per *C. hominis e C. parvum* (sonda TaqMan, gene COWP)
per *G. lamblia* (sonda TaqMan, gene ß giardin)

Polisaccaridi, sali biliari possono inibire Taq polimerasi e bloccare le colonne di estrazione del DNA

Non può misurare con precisione bassi livelli di oocisti nelle acque

vitalità e infettività di (oo)cisti di C e G: **metodi in vivo e in vitro**

nessuno adatto per l'applicazione nella *routine*

metodi in vivo:

saggi di infettività animale

inoculo di (oo)cisti in animali per stimare la capacità di indurre infezione

gold standard ma **costosi e ci sono problemi etici**

Non esiste un modello animale unico X CRYPTO:

la maggior parte dei modelli non è suscettibile all'infezione da *C. hominis* o da altre specie che infettano sporadicamente l'uomo;
modelli murini: consentono l'identificazione di oocisti infettive di *C. parvum* nell'acqua (utilizzati per determinare efficacia di inattivazione di trattamenti chimici e fisici).

metodi in vitro:

vitalità e infettività

- **excistazione del parassita** (scarsa correlazione con test di infettività, buona con test di inclusione di coloranti)
- **inclusione/esclusione di coloranti vitali fluorogeni** informazioni sulla permeabilità (DAPI, IP, PMA, EB, EMA, fluoresceina diacetato) (troppi comportamenti anomali, difficoltà interpretative)
- **cambiamenti morfologici** all'esame microscopico
- **colture cellulari** (capacità di invadere le cellule e replicarsi all'interno)

Enterociti HCT-8 umani supportano lo sviluppo di C. parvum e C. hominis; rilevanti per studiare infettività, relazioni dose-risposta, danno cellulare indotto.
Giardia può essere coltivato con successo in assenza di altre cellule ma il valore di tale saggio per valutare il potenziale infettivo non è chiaro.

- **Reazione Reverse Transcriptase – PCR** di specifici bersagli genici
- **Ibridazione in situ a fluorescenza (FISH)**

RT-PCR

Retrotrascrizione ed amplificazione di sequenze di RNA messaggero

L'RNA messaggero è espressione di vitalità metabolica della cellula

Per *Cryptosporidium* viene utilizzata la sequenza codificante per la proteina Hsp70 inducibile da shock termico.
Gene hsp70 descritto anche per rilevamento di cisti di *Giardia* vitali

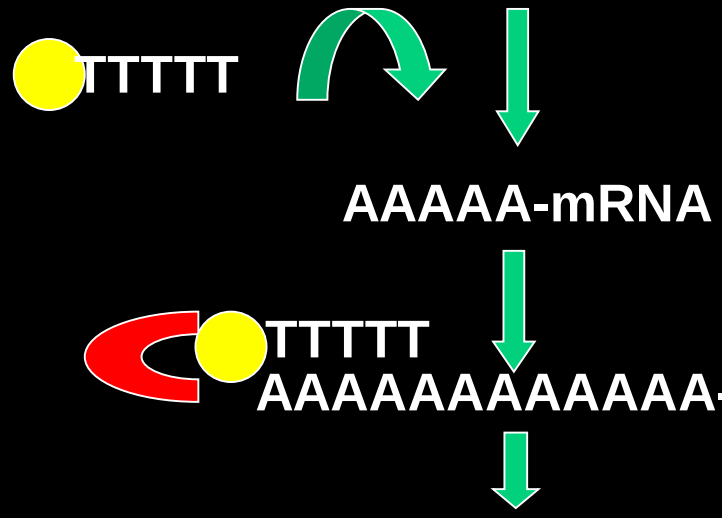
L'induzione della sintesi di un dato mRNA riduce i falsi positivi dovuti alle cellule morte e al DNA libero

Utilizzata per valutare l'efficacia di trattamenti termici e chimici su oocisti di *Cryptosporidium* in matrici semplici e complesse.

RT-PCR

Le oocisti vengono distrutte con cicli di congelamento/scongelamento

L'mRNA viene liberato nel surnatante, dopo averne indotto la produzione con il calore



Vengono addizionate sferette magnetiche con la coda di poli-d(T)

I complessi vengono catturati da un magnete

Viene effettuata la reazione di RT-PCR
Il cDNA prodotto è amplificato per PCR
(sequenza x hsp 70)

I prodotti della PCR vengono visualizzati si gel di agarosio

RT– PCR

Vantaggi	Limiti
– Elevata sensibilità (10 oocisti, 10 cisti) – Elevata specificità – Indicazioni sulla vitalità	- Occorre una quantità sufficiente di cDNA - Acidi umici e fulvici sono inibitori - La procedura di base non consente la quantificazione - Nessuna informazione sulla infettività - Difficoltà nell'estrazione di molecole di RNA intatte, data la loro instabilità

FISH: ibridazione in situ a fluorescenza

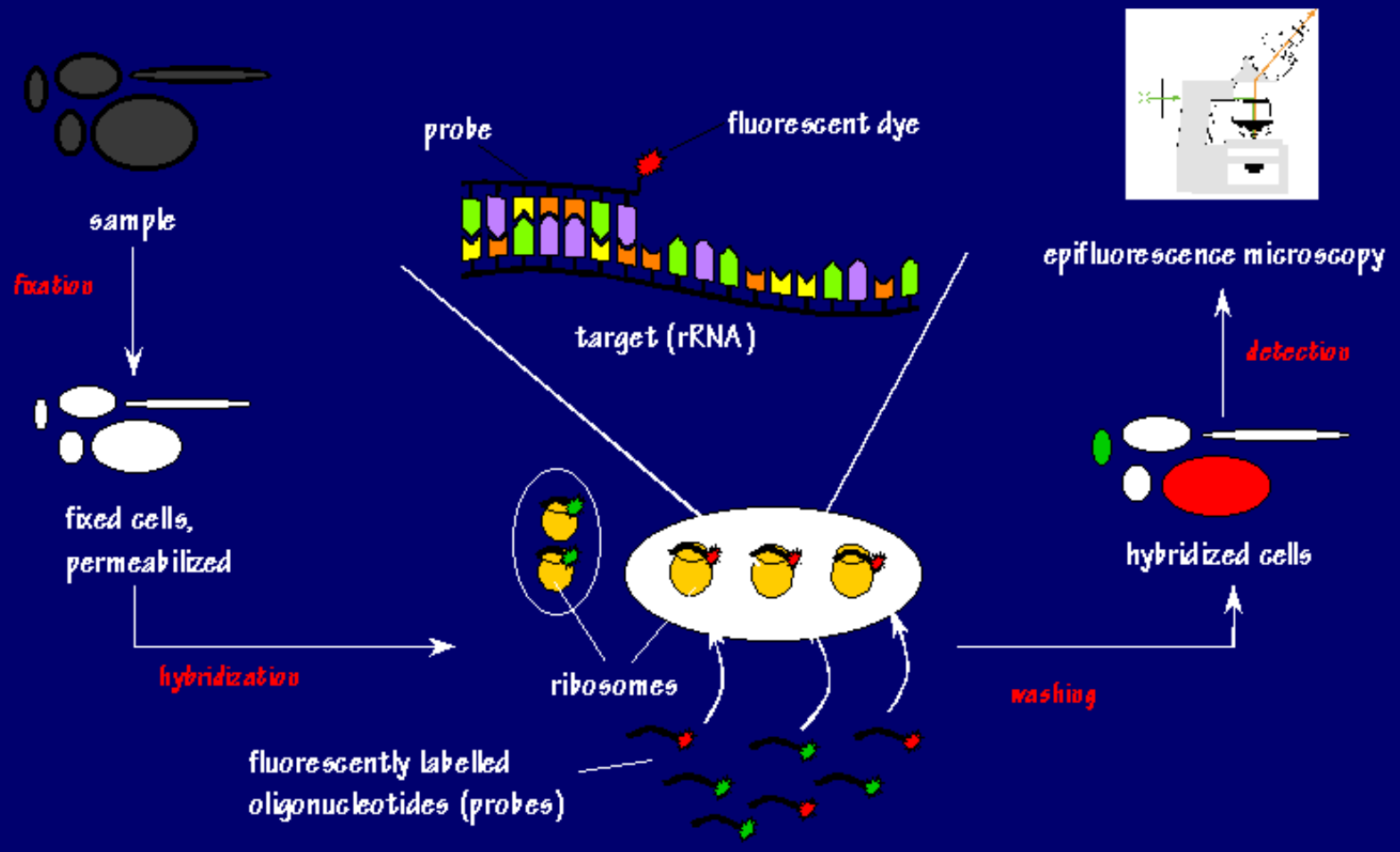
Specifiche sequenze di RNA ribosomiale 18S vengono ibridate in situ con sonde fluorescenti che marcano specificatamente le strutture interne, rendendo fluorescenti solo le (oo)cisti piene

crypto: regione variabile di rRNA SSU (è abbondante)

VANTAGGI

- **Elevata sensibilità**: molecole target (rRNA) presenti in elevato numero
- **Informazioni sulla vitalità:** l'RNA ha vita breve e dovrebbe essere presente solo in cellule vitali o appena morte
- **Elevata specificità:** possibilità di individuare a livello di specie (probe specie specifici)
- Possibilità di utilizzare insieme **più sonde** marcate con differenti fluorocromi
- **Buona correlazione** con i saggi di excistazione in vitro

Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)



FISH: ibridazione in situ a fluorescenza

SVANTAGGI

- Il segnale nei campioni ambientali può essere inficiato dalla presenza di **organismi autofluorescenti**
- La tecnica è utile per campioni con **elevato numero** di (oo)cisti
- Il segnale può essere debole e l'esame microscopico difficile **(La PCR è 10^3-10^4 volte più sensibile delle tecniche a fluorescenza)**
- La sensibilità è correlata al tasso di degradazione dell'rRNA (influenzato da temperatura, pH, salinità, contaminazione da Rnasi e dalla procedura)
- L'utilizzo di sonde a fluorescenza su oocisti/cisti sottoposte a disinfezione chimica non è stato ancora valutato

Cryptosporidium Genotyping Kit

Nested PCR- RFLP (Restriction Fragment Lenght Polymorphism)

Kit invitrogen

- Rimozione materiale adeso ai vetrini per l'IFA mediante lavaggi con tampone di lisi
- Estrazione DNA, previa cicli congelamento/scongelamento
- PCR e nested PCR del gene codificante per la subunità 18S dell'rRNA
- Amplificato della nested PCR è digerito con enzimi di restrizione (Sspl, Vsp I, Dde I) e i frammenti separati per elettroforesi su gel di agarosio
- Il profilo dei frammenti ottenuti consente la discriminazione

Utile per *screening*, si raccomanda di sequenziare i prodotti di PCR

Grazie per l'attenzione

rossella.briancesco@iss.it