“Metodiche analitiche e di campionamento a supporto dell’attività dei Dipartimenti di Sanità Pubblica”

Dott.ssa Lucia Di Gregorio - Arpae Emilia Romagna
LM - Unità microbiologia ambientale e sanitaria di Bologna

arpae
agenzia prevenzione ambiente energia emilia-romagna

Dlgs 31/2001 e s.m - ALLEGATO I - PARTE C - NOTA 2

PARTE C

Parametri indicatori

Parametro	*Valore di parametro*	*Unità di misura*	*Note*
Alluminio	200	µg/l	
Ammonio	0,50	mg/l	
Cloruro	250	mg/l	Nota 1
Clostridium perfringens (spore comprese)	0	Numero/100 ml	Nota 2
Colore	Accettabile per i consumatori e senza variazioni anomale		
Conduttività	2500	µScm⁻¹ a 20° C	Nota 1
Concentrazione ioni idrogeno	≥6,5 e ≤9,5	Unità pH	Note 1 e 3
Ferro	200	µg/l	
Manganese	50	µg/l	
Odore	Accettabile per i consumatori e senza variazioni anomale		
Ossidabilità	5,0	mg/l O_2	Nota 4
Solfato	250	mg/l	Nota 1
Sodio	200	mg/l	
Sapore	Accettabile per i consumatori e senza variazioni anomale		
Conteggio delle colonie a 22° C	Senza variazioni anomale		
Batteri coliformi a 37° C	0	Numero/100 ml	Nota 5
Carbonio organico totale (TOC)	Senza variazioni anomale		
Torbidità	Accettabile per i consumatori e senza variazioni anomale		Nota 6
Durezza *			Il limite inferiore vale per le acque sottoposte a trattamento di addolcimento o di dissalazione
Residuo secco a 180° C **			
Disinfettante residuo ***			

Indipendentemente dalla sensibilità del metodo analitico utilizzato, il risultato deve essere espresso indicando lo stesso numero di decimali riportato in tabella per il valore di parametro.

* valori consigliati: 15-50° F

** valore massimo consigliato: 1500 mg/L

*** valore consigliato 0,2 mg/L (se impiegato) (16).

Cl. perfringens:

Tale parametro non deve essere misurato a meno che le acque provengano o siano influenzate da acque superficiali. In caso di non conformità con il valore parametrico, l' Azienda sanitaria locale competente al controllo dell'approvvigionamento d'acqua deve accertarsi che non sussistano potenziali pericoli per la salute umana derivanti dalla presenza di microrganismi patogeni quali ad esempio il cryptosporidium. I risultati di tutti questi controlli debbono essere inseriti nelle relazioni che debbono essere predisposte ai sensi dell'articolo 18,comma 1.

Table 1. Distribution of confirmed giardiasis cases by country and year, EU/EEA, 2013–2017

Country	2013		2014		2015		2016		2017			
	Number	Rate	Number	Rate	Number	Rate	Number	Rate	Confirmed cases	Rate	ASR	Reported cases
Austria	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Belgium	1 220	-	1 144	-	1270	11.3	1 998	17.7	1 996	17.6	17.5	1 996
Bulgaria	1 873	25.7	1 731	23.9	1245	17.3	1 367	19.1	788	11.1	12.5	788
Croatia	0	0.0	80	1.9	93	2.2	50	1.2	51	1.2	1.3	54
Cyprus	3	0.3	3	0.3	6	0.7	1	0.1	5	0.6	0.6	5
Czech Republic	46	0.4	42	0.4	33	0.3	45	0.4	28	0.3	0.3	28
Denmark	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Estonia	195	14.8	221	16.8	181	13.8	187	14.2	161	12.2	12.3	161
Finland	336	6.2	287	5.3	259	4.7	282	5.1	278	5.1	5.3	278
France	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Germany	4 107	5.1	4 013	5.0	3 583	4.4	3 479	4.2	3 329	4.0	4.2	3 338
Greece	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Hungary	59	0.6	59	0.6	130	1.3	108	1.1	73	0.7	0.8	74
Iceland	20	6.2	22	6.8	25	7.6	19	5.7	26	7.7	7.3	26
Ireland	44	1.0	71	1.5	145	3.1	202	4.3	239	5.0	5.0	240
Italy	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Latvia	37	1.8	73	3.6	184	9.3	76	3.9	49	2.5	2.5	49
Liechtenstein	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Lithuania	13	0.4	13	0.4	9	0.3	10	0.3	9	0.3	0.3	9
Luxembourg	1	0.2	3	0.5	2	0.4	0	0.0	6	1.0	1.0	6
Malta	0	0.0	2	0.5	0	0.0	4	0.9	4	0.9	0.9	4
Netherlands	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Norway	227	4.5	264	5.2	247	4.8	343	6.6	485	9.2	9.1	485
Poland	1 830	4.8	1 871	4.9	1 687	4.4	1 445	3.8	1 229	3.2	3.4	1 229
Portugal	-	-	-	-	26	0.3	30	0.3	45	0.4	0.5	45
Romania	328	-	796	-	959	-	892	-	1 060	-	-	1 060
Slovakia	180	3.3	166	3.1	228	4.2	284	5.2	190	3.5	3.5	190
Slovenia	42	2.0	38	1.8	30	1.5	54	2.6	64	3.1	3.3	64
Spain	885	-	1 487	-	1 627	-	2 069	-	2 953	-	-	2 953
Sweden	1 253	13.1	1 260	13.1	1 473	15.1	1 491	15.1	1 144	11.4	11.3	1 144
United Kingdom	3 840	6.0	3 628	5.6	4 536	7.0	4 723	7.2	5 225	7.9	8.1	5 225
EU/EEA	**16 539**	**5.5**	**17 274**	**5.4**	**17 978**	**5.5**	**19 159**	**5.8**	**19 437**	**5.5**	**5.6**	**19 451**

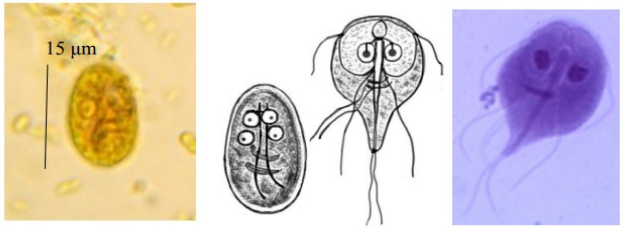
Table 1. Distribution of confirmed cryptosporidiosis cases and rates per 100 000 population by country, EU/EEA, 2013–2017

Country	2013		2014		2015		2016		2017			
	Number	Rate	Number	Rate	Number	Rate	Number	Rate	Confirmed cases	Rate	ASR	Reported cases
Belgium	376	-	229	-	991	8.8	1247	11.0	716	6.3	6.3	716
Bulgaria	0	0.0	3	0.0	0	0.0	4	0.1	6	0.1	0.1	6
Croatia	0	0.0	0	0.0	0	0.0	4	0.1	17	0.4	0.4	17
Cyprus	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.0	0
Czech Republic	2	0.0	1	0.0	2	0.0	2	0.0	5	0.0	0.1	5
Estonia	0	0.0	2	0.2	4	0.3	1	0.1	0	0.0	0.0	0
Finland	24	0.4	31	0.6	31	0.6	71	1.3	250	4.5	4.8	250
Germany	1538	1.9	1719	2.1	1696	2.1	1839	2.2	1693	2.1	2.3	1707
Hungary	6	0.1	8	0.1	41	0.4	16	0.2	7	0.1	0.1	7
Iceland	6	1.9	2	0.6	12	3.6	8	2.4	11	3.3	3.0	11
Ireland	512	11.1	388	8.4	433	9.3	558	11.8	572	12.0	10.1	589
Latvia	2	0.1	3	0.1	3	0.2	3	0.2	4	0.2	0.2	4
Lithuania	2	0.1	1	0.0	4	0.1	0	0.0	1	0.0	0.0	1
Luxembourg	0	0.0	1	0.2	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.0	0
Malta	4	0.9	0	0.0	1	0.2	1	0.2	0	0.0	0.0	0
Netherlands*	975	-	984	-	1767	-	2090	-	1332	-	-	1332
Norway	31	0.6	70	1.4	86	1.7	255	4.9	379	7.2	7.3	379
Poland	1	0.0	5	0.0	3	0.0	6	0.0	7	0.0	0.0	7
Portugal	-	-	-	-	6	0.1	5	0.0	6	0.1	0.1	6
Romania	0	0.0	1	0.0	0	0.0	0	0.0	5	0.0	0.0	5
Slovakia	12	0.2	1	0.0	2	0.0	1	0.0	2	0.0	0.0	2
Slovenia	11	0.5	8	0.4	15	0.7	13	0.6	20	1.0	1.1	20
Spain	107	-	326	-	646	-	238	-	554	-	-	554
Sweden	224	2.3	404	4.2	527	5.4	594	6.0	779	7.8	8.2	779
United Kingdom	4035	6.3	4102	6.4	5901	9.1	6708	10.3	5052	7.7	7.6	5052
EU/EEA	**7868**	**2.3**	**8289**	**2.4**	**12171**	**3.3**	**13664**	**3.8**	**11418**	**3.2**	**3.2**	**11449**

European Centre for Disease Prevention and Control. Introduction to the Annual Epidemiological Report. In : ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2017, [cited 11 September 2018].
Available from: http://ecdc.europa.eu/annual-epidemiological-report/methods

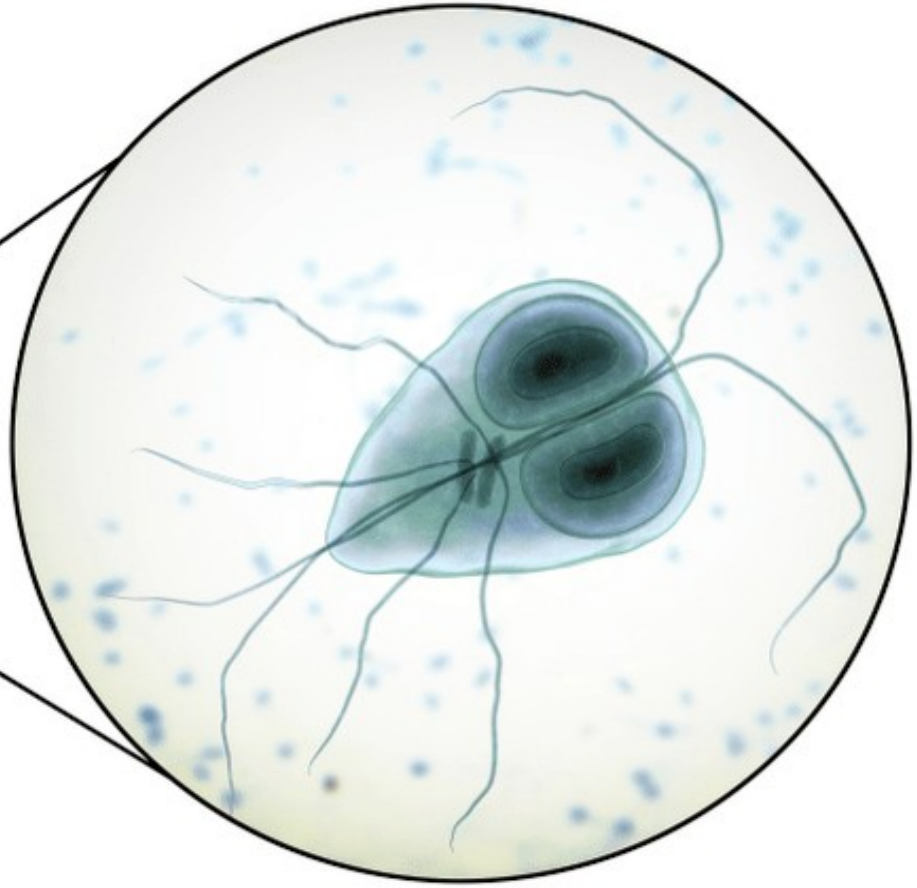
Sorveglianza di Giardia e Cryptosporidium in acque destinate al consumo umano nella Regione Emilia Romagna:

"Progetto di sviluppo di attività analitiche per l'identificazione di cisti di Giardia e di oocisti di Cryptosporidium in campioni di acqua destinati al consumo umano"



Le due forme sviluppate da Giardia duodenalis: cisti (forma di resistenza) e trofozoite (forma vegetativa)

Le due forme assunte da Cryptosporidium durante il suo ciclo vitale: l'oocisti (sinistra), sua forma resistente, e lo sporozoite (destra), forma vegetativa



Metodo applicato:

Rapporti Istisan 07/05 Met ISS A 017B rev.00

(ISO 15553:2006 (E): *Water quality-isolation and identification of Cryptosporidium oocysts and Giardia cysts from water*)

FASE 1: Campionamento mediante concentrazione per filtrazione in situ

FASE 2: Eluizione del filtro

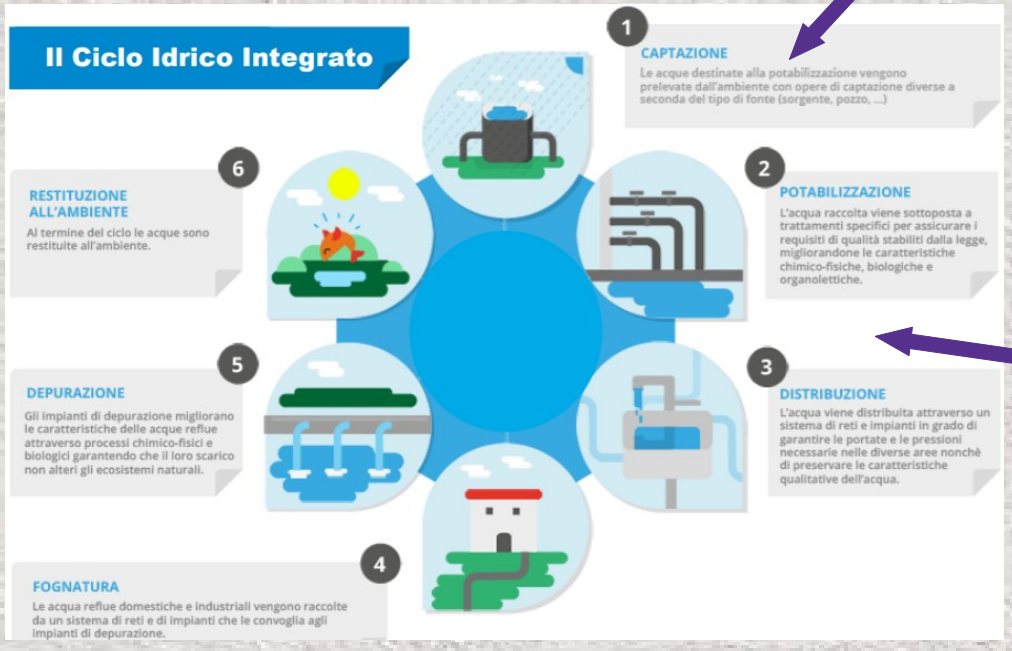
FASE 3: concentrazione e purificazione dell'eluato mediante centrifugazione e separazione immunomagnetica

FASE 4: colorazione e determinazione microscopica mediante immunofluorescenza diretta

FASE 1: CAMPIONAMENTO IN SITU

- Giardiasi / criptosporidiosi: trasmissione fecale-orale
- Acqua principale veicolo di trasmissione
- Cisti di Giardia / oocisti di Cryptosporidium: elevata resistenza a stress ambientali e ai comuni disinfettanti (cloro)
- non vi è relazione tra presenza di cisti/oocisti e batteri indicatori di contaminazione fecale (es. *Cl. Perfringens*, *E.coli*, Enterococchi)

FONTE DI APPROVVIGIONAMENTO A RISCHIO



CAMPIONARE:

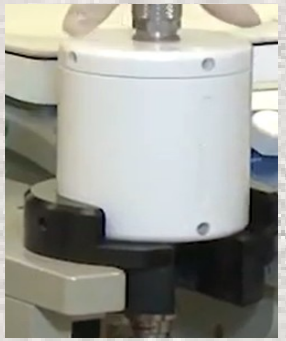
da 10 LITRI → a 1000 LITRI

Acque grezze molto torbide, ricche di particolato

Acque trattate

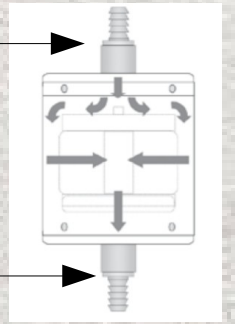
segue….FASE 1: CAMPIONAMENTO IN SITU

MODULO FILTRANTE
FILTA-MAX



ALLOGGIAMENTO-FILTRO

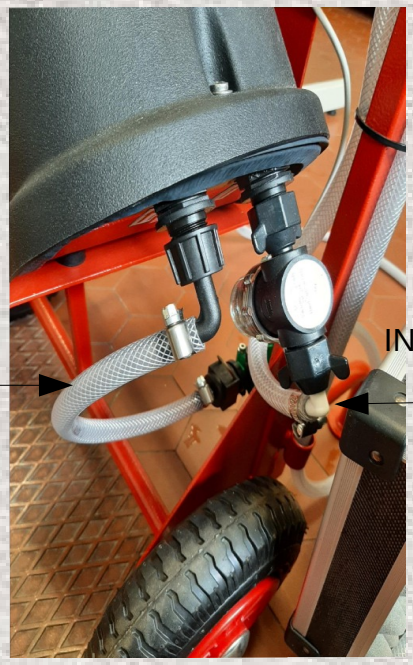
ASSEMBLAMENTO



CAMPIONAMENTO

LETTORE
FLUSSIMETRO

MANOMETRO



USCITA
POMPA

INGRESSO
POMPA

segue….FASE 1: CAMPIONAMENTO IN SITU

1) Collegare fonte di approvvigionamento – ingresso pompa
2) Collegare uscita pompa – ingresso filtro
3) Collegare uscita filtro – tanica raccolta
4) Collegare lettore al flussimetro
5) Accendere pompa e avvinare

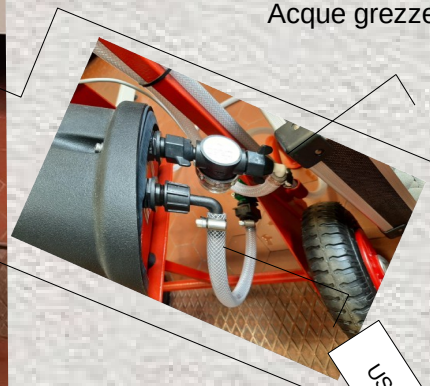
PRESSIONE DI ESERCIZIO: 5 bar

PORTATA: 3 - 4 L/M

6) Accendere lettore e azzerare il contalitri
7) Campionare

da 10 LITRI → a 1000 LITRI

Acque grezze molto torbide — Acque trattate



TEMPO DI CAMPIONAMENTO:

100 litri → circa 40’
500 litri → circa 2h

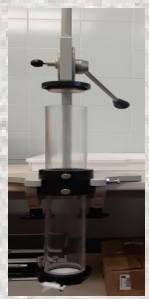
TRASPORTO: (5 ± 3)°C

……IN LABORATORIO…..

FASE 2: ELUIZIONE FILTRO

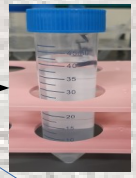
STAZIONE DI LAVAGGIO
FILTA-MAX

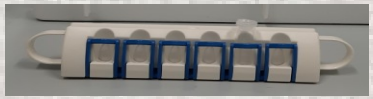
Lavaggio con soluzione tampone PBST1x mediante ripetuti movimenti di compressione e decompressione



FASE 3: CONCENTRAZIONE E SEPARAZIONE IMMUNOMAGNETICA

Concentrazione dell'eluato mediante aspirazione con pompa da vuoto fino ad ottenere un volume finale pari a 20-30 ml

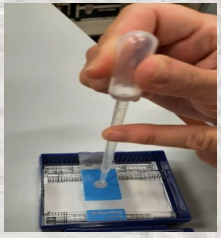




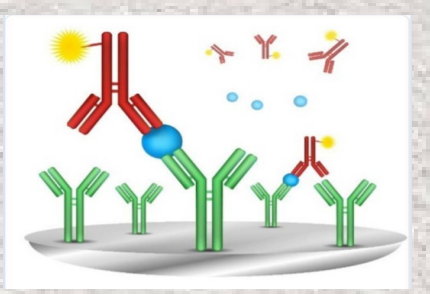
Chiarificazione del concentrato mediante utilizzo di microsfere magnetiche coniugate con anticorpi monoclonali anti-cisti di Giardia e anti-oocisti di Cryptosporidium

…segue……IN LABORATORIO…...

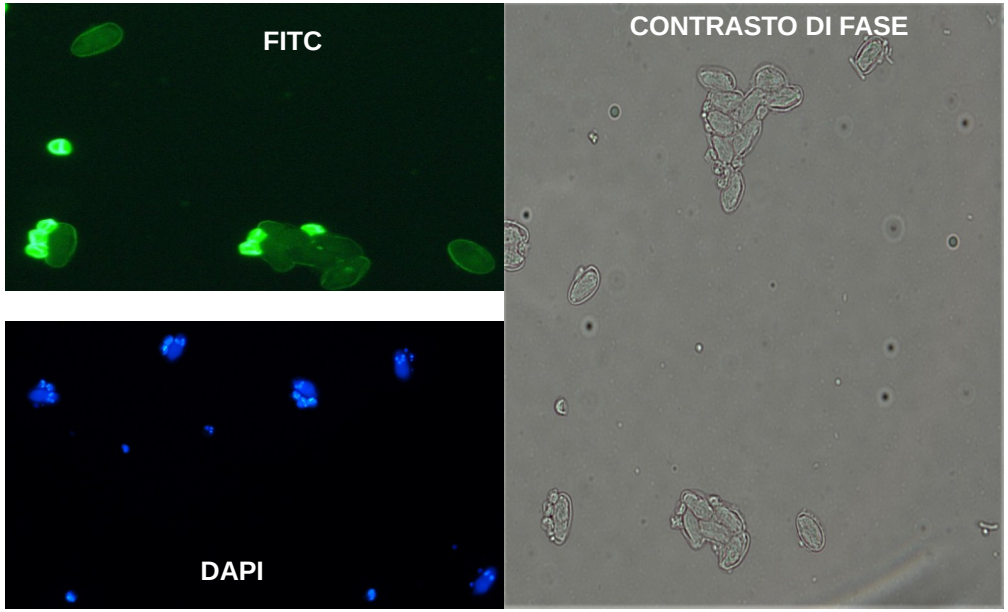
FASE 4: COLORAZIONE E DETERMINAZIONE MICROSCOPICA MEDIANTE IMMUNOFLUORESCENZA DIRETTA

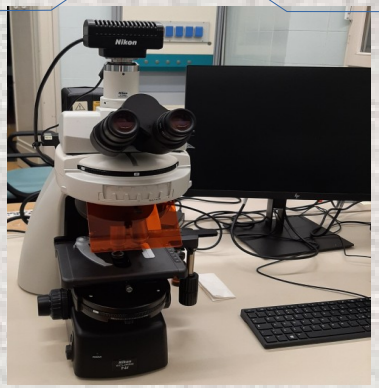


Colorazione con : **FITC** *(isotiocianato di fluoresceina) e* **DAPI** *(4',6-di-amino-2-phenylindole)*



Gli anticorpi monoclonali di topo anti-cisti di Giardia e anti-oocisti di Cryptosporidium coniugati con FITC si legano agli antigeni presenti sulla parete dei protozoi





MICROSCOPIO A EPIFLUORESCENZA

CRITICITÀ E CONCLUSIONI

- TEMPI DI CAMPIONAMENTO E ANALISI LUNGHI

- DIFFICOLTÀ NEL REPERIRE I MATERIALI PER LE PROVE

- ESPERIENZA DA ACQUISIRE PER IL RICONOSCIMENTO DEI PROTOZOI

- AFFIANCAMENTO AGLI OPERATORI DEL DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA PER IL CAMPIONAMENTO IN SITU

...GRAZIE PER L'ATTENZIONE...