

7130. Oocisti di *Cryptosporidium* e cisti di *Giardia*

1. Introduzione

1.1 Generalità

Il protozoo coccide *Cryptosporidium parvum* ed il protozoo flagellato *Giardia lamblia* sono agenti eziologici di forme acute di gastroenterite nell'uomo. Entrambe le infezioni sono trasmesse per via fecale-orale attraverso l'ingestione di oocisti di *Cryptosporidium* e di cisti di *Giardia*. Infezioni da *Cryptosporidium* e da *Giardia* sono ampiamente segnalate con una prevalenza nei paesi industrializzati dell'1-3% per il primo e del 2-5% per il secondo e, nei paesi in via di sviluppo, del 5-10% per *Cryptosporidium* e del 20-30% per *Giardia*. I dati più recenti hanno dimostrato che le oocisti e le cisti possono essere ritrovate in acque superficiali e profonde, in acque potabili marine e reflue. L'acqua è stata pertanto riconosciuta tra i principali veicoli di infezione. La scarsa specificità d'ospite favorisce la diffusione dei parassiti nell'ambiente, come anche l'elevato numero di cisti ed oocisti emesse dagli animali infetti e la loro straordinaria resistenza alla disinfezione ed alle condizioni ambientali. Le acque superficiali possono essere contaminate sia direttamente dall'apporto di feci emesse da animali infetti, sia attraverso acque di dilavamento di suoli adibiti al pascolo di animali infetti, acque di scarico e percolati. Nelle acque superficiali il valore di concentrazione di oocisti di *Cryptosporidium* e di cisti di *Giardia* può variare da 0 a 10²/L.

In considerazione della potenziale diffusione nell'ambiente dei due parassiti e del ruolo che essi possono assumere in relazione alla salute umana, si pone la necessità di definire metodi idonei alla loro ricerca nelle acque anche in funzione della loro capacità di resistenza ai trattamenti di disinfezione.

1.2 Obiettivo

I metodi consentono di valutare la concentrazione di oocisti di *Cryptosporidium* e di cisti di *Giardia* in un volume noto di acqua.

2. Metodo 1

2.1 Principio del metodo

Volumi noti del campione da analizzare sono filtrati attraverso un filtro a capsula; si procede quindi all'eluizione delle cisti ed oocisti dal filtro e alla concentrazione e purificazione dell'eluato tramite centrifugazione e flottazione. Infine, mediante immunofluorescenza diretta, si procede alla determinazione e al conteggio al microscopio.

2.2 Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento. Non consente la determinazione dei parassiti a livello di specie né permette di valutarne l'infettività e la vitalità.

2.3 Possibili interferenze

Valori elevati di torbidità possono diminuire l'efficienza di recupero del metodo (20-35% per le oocisti di *Cryptosporidium* e 45-95% per le cisti di *Giardia*, prima della flottazione). Campioni particolarmente torbidi e con presenza di solidi sospesi possono intasare i pori del filtro e rendere più difficile la fase di filtrazione. Inoltre, durante la fase di identificazione al microscopio particelle di detriti eventualmente non eliminate durante i lavaggi possono nascondere la presenza di cisti ed oocisti.

3. Reattivi

3.1 Soluzione tamponata di Formaldeide al 10%

Composizione:

Na ₂ HPO ₄	0,76	g
NaH ₂ PO ₄	0,02	g
Acqua distillata	800	mL

Sciogliere i composti adottando le dovute precauzioni ed operando sotto cappa chimica aggiungendo 100 mL di Formaldeide e portando ad 1L con acqua distillata.

3.2 Soluzione di PBS (Phosphatase Buffer Saline) 10x

Composizione:

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

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata. Aggiustare il pH a 7,2±0,2 con NaOH 0,1 M o HCl 0,1 M. Sterilizzare in autoclave per 15±1 minuti a 121±3°C.

La soluzione è anche disponibile in commercio pronta per l'uso.

3.3 Soluzione di Percoll-Saccarosio

Composizione:

Percoll (densità=1,13)	45	mL
Saccarosio 2,5 M	10	mL
Acqua distillata	45	mL

Mescolare i componenti e controllare che la densità sia tra 1,09-1,1 con un idrometro. Nel corso della procedura mantenere i reattivi a circa +4°C.

3.4 Soluzione di Saccarosio 2,5 M

Composizione:

Saccarosio	855,8	g
Acqua distillata	400	mL

Preparare la soluzione sciogliendo il saccarosio in acqua distillata preriscaldata. Attendere che la soluzione si raffreddi, quindi portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

3.5 *Tampone per eluizione*

Composizione:

Laureth-12	1	g
Acqua distillata	100	mL

Preparare la soluzione sciogliendo il componente in acqua distillata in un beaker di vetro pi-
rex. Scaldare su una piastra o in un forno a microonde per consentire al Laureth-12 di scio-
gliersi. La soluzione viene quindi trasferita in un matraccio da 1 L, il beaker sciacquato nu-
merose volte con acqua distillata e i liquidi di risciacquo raccolti nel matraccio stesso. Ag-
giungere quindi i seguenti reattivi:

Tris 1 M, pH 7,4	10	mL
EDTA, 2Na 0,5 M, pH 8	2	mL
Antischiuma A	150	µL

Portare ad 1 L con acqua distillata.

3.6 *Tris 1 M, pH 7,4*

Composizione:

Tris	121,1	g
Acqua distillata	700	mL

Preparare la soluzione sciogliendo il componente in acqua distillata. Portare a pH 7,4±0,2
con HCl o NaOH 1 M. Portare a 1 L con acqua distillata. Sterilizzare con un filtro a mem-
brana da 0,22 µm; conservare in un contenitore di plastica a temperatura ambiente.

3.7 *EDTA, 2Na·2H₂O, 0,5 M, pH 8,0*

Composizione:

acido Etilendiaminotetracetico disodico, diidrato (EDTA, 2Na·2H ₂ O)		186,1 g
Acqua distillata		

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

3.8 *Soluzione di lavaggio A*

Composizione:

Sodio Dodecil Solfato (SDS)	1	g
Acqua distillata	300	mL

Preparare la soluzione sciogliendo l'SDS in acqua distillata.
Aggiungere poi i seguenti componenti:

PBS 10x	100	mL
Tween-80	1	mL
Antischiuma A	500	µL

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

3.9 Soluzione di lavaggio B

Composizione:		
Tween 20	0,5	mL
PBS 10 x	100	mL

Preparare la soluzione portando a volume finale di 1 L con acqua distillata.

3.10 "Kit" per la determinazione di oocisti e di cisti mediante immunofluorescenza diretta

I kit presenti in commercio sono composti da:

- anticorpi monoclonali diretti contro le oocisti di *Cryptosporidium* e le cisti di *Giardia* coniugati con Isotiocianato di Fluoresceina (FITC);
- controllo positivo;
- controllo negativo;
- tampone di lavaggio;
- soluzione di montaggio ("Mounting Medium").

4. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi è necessario disporre di:

- agitatore con braccetti;
- apparato di filtrazione per filtri a membrana da 25 mm di diametro;
- camera umida;
- centrifuga refrigerata (intorno a +4°C) a rotore basculante per contenitori da 50-250 mL;
- contaltri;
- contenitori da centrifuga da 250 mL con fondo conico o tipo bottiglia;
- contenitori da centrifuga monouso da 50 e 15 mL con fondo conico;
- filtro a capsula in polietersulfone, (1 µm di porosità, 6 cm di diametro, 12 cm di lunghezza, 1300 cm² di superficie);
- incubatore settabile a 36±1 °C;
- membrane di policarbonato, 1,2 µm, 25 mm di diametro;
- microscopio ad epifluorescenza con filtri di eccitazione 450-490 nm, filtro barriera 515-520, obiettivi 20, 40 e 100x ed oculare con micrometro lineare. È necessario disporre del contrasto di fase e qualora possibile del contrasto ad interferenza differenziale (DIC) per l'obiettivo 100x;
- pipette da 1 mL, 10 mL e 25 mL;
- pipettatrice automatica;
- pompa peristaltica;
- regolatore di flusso;
- tubi semirigidi di connessione con relativi raccordi e fascette;
- vetrini a pozzetto (compresi nel "kit" per l'immunofluorescenza);
- "vortex".

5. Procedura

5.1 Campionamento e filtrazione

Questo metodo consente di campionare volumi variabili d'acqua (10-700 L) in relazione alla sua torbidità, usando eventualmente più cartucce per filtrare il volume appropriato. La filtrazione deve avvenire con un flusso non superiore a 2 L/min.

5.2 *Eluizione della capsula*

Per l'eluizione di una capsula si utilizzano 240 mL di tampone per eluizione (3.5). Con un cilindro graduato aggiungere 120 mL di tampone per eluizione attraverso l'estremità di entrata della capsula. La capsula viene quindi posta nello "shaker" in modo che la valvola di sfogo sia posta sulla sua estremità di ingresso sia posizionata a ore 12. Si procede all'agitazione per 5 minuti a 600 rpm. L'eluato viene raccolto in un tubo da centrifuga. Aggiungere gli altri 120 mL di tampone per eluizione nella capsula e procedere ad una seconda agitazione per 5 minuti a 600 rpm, posizionando il lato di ingresso della capsula in modo tale che la valvola di sfogo sia ad ore 9. Aggiungere l'eluato ottenuto al precedente nel tubo da centrifuga. Centrifugare a 1100 x g per 10 minuti e decelerare lentamente senza usare il freno. Eliminare il supernatante con l'accortezza di non disturbare il "pellet". Misurare il volume del campione concentrato (1-10 mL). La procedura può essere interrotta in questa fase aggiungendo al campione un uguale volume di soluzione tamponata di formaldeide al 10% (3.1). Si può procedere direttamente all'analisi del campione per immunofluorescenza o, nel caso l'eccessiva torbidità del campione non lo consentisse, chiarificare il campione per flottazione.

5.3 *Chiarificazione per flottazione*

A 19,5 mL di soluzione di lavaggio A (3.8) si aggiungono 0,5 mL di campione concentrato, utilizzando una provetta da 50 mL. Miscelare ed iniettare, con una siringa provvista di cannula, 30 mL di soluzione di Percoll-Saccarosio (3.3) al di sotto della sospensione, con l'accortezza di non arrecare danno all'interfaccia tra le due soluzioni. Centrifugare a 1050 x g per 10 minuti a circa +4°C accelerando lentamente e senza usare il freno alla fine della centrifugazione. Prelevare il supernatante, l'interfaccia e circa 5 mL di Percoll-Saccarosio e raccoglierlo in una provetta da 50 mL. Portare a 50 mL con la soluzione di lavaggio B (3.9) mescolare con vortex e centrifugare a 1050 x g per 15 minuti. Scartare il supernatante fino ad ottenere un "pellet" di 1-5 mL.

5.4 *Determinazione mediante immunofluorescenza diretta*

Si usano anticorpi monoclonali anti-cisti di *Giardia* e anti-oocisti di *Cryptosporidium* coniugati con FITC (3.10) che si legano ad antigeni presenti sulle pareti. Se l'analisi viene effettuata su vetrino a pozzetto, si trasferiscono 10-30 µL di campione in un pozzetto, 10 µL di controllo positivo in un altro pozzetto e 10 µL di controllo negativo in un altro ancora; si lascia asciugare a temperatura ambiente o più rapidamente in stufa a circa 36°C. Fissare ciascun campione secondo le modalità indicate dalla ditta produttrice del "kit". Mettere 20-50 µL del reagente contenente anticorpi fluoresceinati su ciascun pozzetto ed incubare il vetrino in camera umida, al buio, a temperatura ambiente per 30 minuti. Lavare delicatamente il vetrino con PBS 1x o con tampone di lavaggio e far asciugare all'aria. Porre una goccia di soluzione di montaggio su ciascun pozzetto e farvi aderire un vetrino coprioggetto, facendo attenzione a non formare bolle. Se l'immunofluorescenza viene condotta su filtro, porre la membrana (porosità 1,2 µm, in polycarbonato, di diametro 25 mm), sul supporto di filtrazione, bagnarla con PBS 1x e filtrare 1 mL di campione. Aggiungere una goccia del reagente contenente anticorpi fluoresceinati. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente al buio. Filtrare, quindi lavare per tre volte la membrana aggiungendo 3 mL di PBS 1 x o di tampone di lavaggio e filtrando di volta in volta. Eliminare ogni traccia di liquido mediante filtrazione. Porre una goccia di liquido di montaggio su un vetrino, farvi aderire la membrana, e montare su questa il vetrino coprioggetto con il liquido di montaggio.

5.5 *Esame microscopico*

Osservare l'intera superficie di ogni pozzetto a 200 o 400 ingrandimenti con il microscopio

ad epifluorescenza ed individuare le strutture fluorescenti verde mela con forma e dimensioni caratteristiche delle cisti di *Giardia* (lunghezza 8-12 μm e larghezza 7-10 μm) e oocisti di *Cryptosporidium* (3,5-6,5 μm). Segnare le coordinate del vetrino dove sono state rinvenute le cisti e le oocisti ed effettuare l'osservazione delle stesse strutture in epifluorescenza a 1000 ingrandimenti in immersione, quindi passare sull'obiettivo con il contrasto di fase o con il contrasto ad interferenza differenziale (DIC). L'osservazione a contrasto di fase consente di distinguere le cisti ed oocisti piene da quelle vuote fornendo in tal modo indicazioni sulla presunta vitalità delle cisti ed oocisti piene. L'osservazione a contrasto interferenziale permette invece di valutare la presenza di strutture interne (nuclei, corpi mediani, spazio peritrofico nella *Giardia*; sporozoitii e granuli residui nel *Cryptosporidium*), fornendo sia una ulteriore conferma alla determinazione, sia l'opportunità di distinguere tra cisti ed oocisti vuote, contenenti strutture amorfe oppure contenenti strutture caratteristiche ben conservate. Annotare il numero totale di cisti di *Giardia* e di oocisti di *Cryptosporidium* ed eventualmente quelle che si presentano piene o vuote e con o senza strutture interne.

5.6 Interpretazione dei risultati

La presenza di strutture conformi per fluorescenza, forma e dimensioni a cisti di *Giardia* e oocisti di *Cryptosporidium* permette di considerare il campione presuntivamente positivo. Alcuni organismi (alghe e lieviti) e detriti autofluorescenti alla stessa lunghezza d'onda del FITC possono essere registrati come falsi positivi ed interferire nei risultati dell'analisi. L'impiego di disinfettanti può dar luogo ad interferenze nella individuazione delle strutture interne alle cisti ed oocisti perché può causarne la parziale distruzione o trasformazione in strutture amorfe difficilmente riconoscibili.

6. Espressione dei risultati

Il numero di cisti ed oocisti contate sull'intera superficie di ciascun pozzetto si riferisce al volume di campione ivi deposto; tale numero viene quindi rapportato al volume di "pellet" chiarificato (0,5 mL) e moltiplicato per il volume dell'eluato (1-10 mL). Il risultato viene infine rapportato al numero di litri di campione filtrati.

7. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione.

Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

8. Metodo 2

8.1 Principio del metodo

Prevede la filtrazione di campioni di acqua su membrana di porosità nominale di 0,12 μm , la dissoluzione della membrana, la concentrazione dell'emulsione mediante centrifugazione, il lavaggio del "pellet" con solventi, la determinazione e la conta al microscopio delle cisti ed oocisti mediante immunofluorescenza diretta.

8.2 Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento. Non consente la determinazione dei parassiti a livello di specie né permette di valutarne l'infettività e la vitalità.

8.3 Possibili interferenze

Valori elevati di torbidità possono diminuire l'efficienza di recupero del metodo (25-40% per le oocisti di *Cryptosporidium* e 50-60% per le cisti di *Giardia*, prima della flottazione). Campioni particolarmente torbidi e con presenza di solidi sospesi possono intasare i pori del filtro e rendere più difficile la fase di filtrazione. Inoltre, durante la fase di identificazione al microscopio particelle di detriti eventualmente non eliminate durante i lavaggi possono nascondere la presenza di cisti ed oocisti.

9. Reattivi

9.1 Acetone

9.2 Etanolo

9.3 Etanolo al 70%

Aggiungere a 700 mL di Etanolo 300 mL di acqua distillata e mescolare i due componenti.

9.4 Soluzione tamponata di Formaldeide al 10%

Composizione:

Na ₂ HPO ₄	0,76	g
NaH ₂ PO ₄	0,02	g
Acqua distillata	800	mL

Sciogliere i composti adottando le dovute precauzioni ed operando sotto cappa chimica aggiungendo 100 mL di Formaldeide e portando ad 1L con acqua distillata.

9.5 Soluzione di PBS (Phosphatase Buffer Saline) 10x

Composizione:

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

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata. Aggiustare il pH a 7,2±0,2 con NaOH 0,1 M o HCl 0,1 M. Sterilizzare in autoclave per 15±1 minuti a 121±3°C.

La soluzione è anche disponibile in commercio pronta per l'uso.

9.6 Soluzione di Percoll-Saccarosio

Composizione:

Percoll (densità=1,13)	45	mL
Saccarosio 2,5 M	10	mL
Acqua distillata	45	mL

Mescolare i componenti e controllare che la densità sia tra 1,09-1,1 con un idrometro. Nel corso della procedura mantenere i reattivi a circa +4°C.

9.7 Soluzione di Saccarosio 2,5 M

Composizione:

Saccarosio	855,8	g
Acqua distillata	400	mL

Preparare la soluzione sciogliendo il saccarosio in acqua distillata preriscaldata. Attendere che la soluzione si raffreddi, quindi portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

9.8 Soluzione di lavaggio A

Composizione:

Sodio Dodecil Solfato (SDS)	1	g
Acqua distillata	300	mL

Preparare la soluzione sciogliendo l'SDS in acqua distillata. Aggiungere poi i seguenti componenti:

PBS 10x	100	mL
Tween-80	1	mL
Antischiuma A	500	µL

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

9.9 Soluzione di lavaggio B

Composizione:

Tween 20	0,5	mL
PBS 10 x	100	mL

Preparare la soluzione portando a volume finale di 1 L con acqua distillata.

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

I kit presenti in commercio sono composti da:

- anticorpi monoclonali diretti contro le oocisti di *Cryptosporidium* e le cisti di *Giardia* coniugati con Isotiocianato di Fluoresceina (FITC);
- controllo positivo;
- controllo negativo;
- tampone di lavaggio;
- soluzione di montaggio ("Mounting Medium").

10. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi è necessario disporre di:

- apparato di filtrazione per filtri a membrana da 25 mm di diametro;
- camera umida;
- centrifuga refrigerata (intorno a +4°C) a rotore basculante per contenitori da 50-500 mL;
- contalitri;
- contenitori da centrifuga in polipropilene (PP) o in etilene propilene fluorato (teflon-FEP), da 50 mL con fondo conico;

- filtro a membrana in acetato di cellulosa con porosità nominale 1,2 μm , diametro 142 mm;
- membrane in policarbonato, di porosità 1,2 μm e di diametro 25 mm;
- microscopio a epifluorescenza con filtri di eccitazione 450-490 nm, filtro barriera 515-520, obiettivi 20, 40 e 100x ed oculare con micrometro lineare. È necessario disporre del contrasto di fase o, meglio, del contrasto ad interferenza differenziale (DIC) per l'obiettivo 100x;
- regolatore di flusso;
- supporto per filtro a membrana da 142 mm;
- tubi semirigidi di connessione con relativi raccordi e fascette.

11. Procedura

11.1 Campionamento e filtrazione

Il metodo consente di analizzare volumi variabili d'acqua (5-400 L) in relazione alla sua torbidità, usando eventualmente più membrane per filtrare il volume appropriato.

La pompa aspirante è connessa al supporto per il filtro a membrana mediante tubo semirigido e un prefiltra (porosità 100-300 μm) è interposto tra la pompa ed il supporto stesso. Nella filtrazione si consiglia di non superare la pressione di circa 2 bar.

Rimuovere la membrana dal supporto mediante pinzette e porla in una provetta da centrifuga da 50 mL. Durante il trasporto mantenere le provette alla temperatura di circa +4°C. Conservare alla stessa temperatura se non si procede subito alla dissoluzione. Si consiglia di trattare il campione entro 24-48 ore dal prelievo.

11.2 Dissoluzione della membrana

Riempire la provetta con acetone (9.1) fino a portarlo a 50 mL. Agitare mediante vortex per 2-3 minuti, fino alla completa dissoluzione della membrana.

Centrifugare a 7000 x g per 15 minuti e attendere che il rotore si fermi senza usare il freno. Scartare il supernatante facendo attenzione a non disturbare il "pellet" (arrestandosi a 2 cm dal fondo). Riempire nuovamente la provetta con acetone e risospingere il "pellet" agitando mediante vortex o eventualmente con l'aiuto di una pipetta. Centrifugare a 7000 x g per 15 minuti. Eliminare il supernatante come sopra indicato.

11.3 Lavaggi del "pellet"

Portare il "pellet" a 50 mL con etanolo (9.2) e risospenderlo mediante vortex. Centrifugare a 7000 x g per 15 minuti, aspirare il supernatante sospendere nuovamente il "pellet" portandolo a 50 mL con etanolo al 70% (9.3) ed agitando. Centrifugare a 7000 x g per 15 minuti, scartare il supernatante e risospingere il "pellet" con la soluzione di lavaggio A (9.8), sempre portandolo a 50 mL. Agitare mediante vortex. Centrifugare a 7000 x g per 15 minuti, scartare il supernatante e risospingere il "pellet" in PBS 1x (volume finale del campione circa 1-5 mL). Misurare il volume. Il trattamento può essere sospeso in questa fase aggiungendo al campione un uguale volume di soluzione tamponata di formaldeide al 10% (9.4).

Qualora il procedimento di concentrazione porti ad un campione finale con eccessiva torbidità, per un'analisi diretta al microscopio a fluorescenza si procede alla chiarificazione del campione.

11.4 Chiarificazione per flottazione

Procedere come al Paragrafo (5.3).

11.5 *Determinazione mediante immunofluorescenza diretta*

Procedere come al Paragrafo (5.4).

11.6 *Esame microscopico*

Procedere come al Paragrafo (5.5).

11.7 *Interpretazione dei risultati*

Procedere come al Paragrafo (5.6).

12. Espressione dei risultati

Procedere come al Capitolo (6).

13. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

BIBLIOGRAFIA

ALDOM J.E. & CHAGLA A.H. (1995): "Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by a membrane filter dissolution method", *Appl. Environ. Microbiol.*, **20**, 186-187.

GRACZYK T.K., CRANFIELD M.R. & FAYER R. (1997): "Recovery of waterborne oocysts of *Cryptosporidium* from water samples by the membrane-filter dissolution method", *Parasitol. Res.*, **83**, 121-125.

GRACZYK T.K., FAYER R., CRANFIELD M.R. & OWENS R. (1997): "*Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from water by the membrane dissolution method retain their infectivity", *J. Parasitol.*, **83** (1), 111-114.