

CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI MICROBIOLOGICI

0. Generalità

L'insieme dei procedimenti e delle operazioni che intercorrono tra il momento del prelievo del campione e lo svolgimento di un'analisi microbiologica rappresenta una delle fasi più delicate dell'intero procedimento analitico. I risultati analitici, e in particolare quelli microbiologici, infatti, devono permettere di stabilire le caratteristiche della matrice analizzata nelle condizioni in cui essa si trova nel momento in cui viene effettuato il prelievo. La fase pre-analitica, raccolta del campione, trasporto e sua conservazione, incide in misura non trascurabile sull'incertezza totale del risultato dell'analisi, diventando quindi strumento indispensabile per ottenere risultati analitici attendibili e affidabili.

La matrice acqua costituisce un elemento di relativa facile manipolazione a livello analitico, ma le sue caratteristiche microbiologiche-chimiche-fisiche, specifiche per ogni tipologia, possono costituire fonte di instabilità quali-quantitativa dei suoi costituenti.

Una rilevanza particolare sugli esiti delle analisi microbiologiche è da attribuire alla disposizione e alla densità delle forme viventi in acqua. In condizioni ideali di omogeneità, la distribuzione dei microrganismi nell'acqua dovrebbe approssimarsi alla distribuzione di Poisson che, in realtà, si osserva generalmente solo a basse densità di organismi. Più spesso invece la distribuzione ha una varianza maggiore di quella attesa. Questa particolarità è dovuta alla tendenza all'aggregazione degli agenti microbici che, non più omogeneamente distribuiti, si vengono a trovare nell'acqua con una distribuzione spaziale anomala. Aggregazione, adesione a materiale particolato, a superfici e ad altri organismi possono prolungare il tempo di permanenza dei microrganismi nelle acque che è comunque anche influenzato dal loro stato di vitalità. Infatti, l'acqua, e quella disinfettata in particolare, rappresenta una matrice non favorevole alla sopravvivenza delle forme microbiche. Soprattutto le forme batteriche alloctone vengono a ritrovarsi in condizioni ambientali ostili e fattori fisici-chimico-biologici contribuiscono a ridurne le concentrazioni. Cellule batteriche sottoposte a condizioni di stress ambientale possono comunque sopravvivere e permanere a stadi diversi di vitalità, ma più spesso, pur restando metabolicamente attive, possono perdere la capacità di moltiplicarsi in condizioni standard di laboratorio, rimanendo quindi vitali ma diventando non coltivabili. A questo si aggiunge che batteri danneggiati possono non essere più in grado di esprimere le loro specifiche caratteristiche fenotipiche, condizionando quindi la risposta di analisi effettuate con i tradizionali metodi colturali. In tale condizione le cellule microbiche sono comunque in grado di sopravvivere e, se inoculate in ospiti sensibili, potrebbero ancora essere in grado di indurre malattie.

Per individuare le caratteristiche di qualità di un'acqua e per seguire le sue variazioni temporali è innanzitutto necessario che i campioni da analizzare siano il più possibile rappresentativi delle reali condizioni qualitative e quantitative esistenti nella matrice. Campioni rappresentativi possono essere ricavati solo sulla base di piani di campionamento che prevedano obiettivi del prelievo, individuazione delle stazioni di prelievo, tempi e frequenze con cui debbono essere raccolti i campioni, come anche modalità di manipolazione e conservazione dei campioni, eventuali parametri da determinare *in situ* e criteri di valutazione e gestione dei dati. All'interno di un programma di controllo di qualità, è importante che ogni singolo fattore che potenzialmente ha influenza sul processo di campionamento e, di conseguenza, sul risultato finale sia identificato e coerentemente vengano adottate le misure di controllo più idonee.

1. Campo di applicazione

La procedura viene utilizzata per campioni di acque sorgive, sotterranee e superficiali, destinate o da destinare al consumo umano da analizzare dal punto di vista microbiologico.

2. Prelievo dei campioni

Il campionamento si svolge secondo una serie di procedure che permettono di raccogliere un'aliquota ridotta dell'acqua da sottoporre ad analisi. L'esecuzione dell'esame microbiologico delle acque destinate al consumo umano prevede che il prelievo dell'acqua da esaminare venga effettuato mediante un "campionamento istantaneo" che consiste nella raccolta di un unico campione in un'unica soluzione, in punti rappresentativi ed in un tempo breve. Questo tipo di campionamento è distintivo soltanto delle condizioni contingenti presenti all'atto del prelievo.

Al momento del campionamento è necessario considerare con attenzione i volumi di acqua da prelevare. Essi vanno definiti in funzione dei parametri da determinare e comunque devono essere superiori al minimo necessario per procedere allo svolgimento degli esami richiesti.

Il prelievo dei campioni microbiologici deve essere effettuato con recipienti sterili, a perfetta tenuta, di materiale idoneo e utilizzati solo a questo scopo. In genere, contenitori di capacità di 500 mL sono sufficienti per l'analisi dei parametri indicatori. Di utilità sono le bottiglie di vetro Pyrex e di materiale plastico.

Le bottiglie di vetro Pyrex (borosilicato) devono comunque essere sterilizzate in laboratorio a calore secco (a circa 160° per 60 minuti) o a calore umido (a circa 121° per 20 minuti) in condizioni controllate e utilizzate entro tre mesi dalla sterilizzazione se conservate in modo idoneo. Prima della sterilizzazione, i tappi delle bottiglie devono essere ricoperti da fogli protettivi (in genere di alluminio).

Le bottiglie monouso in materiale plastico, generalmente polietilene, disponibili in commercio, sono già sterili e hanno il vantaggio di essere leggere, resistenti alle variazioni termiche ed economiche; anche in questo caso è necessario attenersi alla data di scadenza indicata dal produttore. Per la raccolta di campioni da analizzare dal punto di vista microbiologico non possono essere usati contenitori metallici.

Per la ricerca di patogeni (virus, parassiti), e quindi eventualmente per la necessità di prelevare grandi volumi di acqua (100-1000 mL), spesso è opportuno effettuare il prelievo/concentrazione del campione *in situ*.

Pertanto, in funzione dell'esame da svolgere, è opportuno, preventivamente al prelievo, verificare il volume occorrente allo svolgimento dell'analisi indicato in ciascuno dei metodi riportati di seguito.

È di fondamentale importanza che durante le procedure di campionamento sia evitata qualsiasi contaminazione e modificazione della qualità del campione da esaminare.

Le acque destinate al consumo umano sono spesso disinfettate e contengono quindi tracce di cloro. Bottiglie/contenitori per i prelievi devono quindi contenere sodio tiosolfato in concentrazione idonea ad inibire l'azione del disinfettante. Ai valori di pH normalmente rilevabili delle acque potabili è generalmente sufficiente aggiungere sodio tiosolfato pentaidrato a una concentrazione di 18 mg/L che è in grado di neutralizzare concentrazioni di cloro residuo libero e combinato superiori a 3 mg/L. Poiché l'introduzione, in bottiglie già sterilizzate, di una soluzione, se pure sterile, di neutralizzante può comportare il rischio di una contaminazione, è opportuno quindi che, prima della sterilizzazione delle bottiglie, venga aggiunta una soluzione di sodio tiosolfato pentaidrato all'1,8% m/v (corrispondente a circa 0,1 mL) per ogni 100 mL di capacità della bottiglia. La presenza di sodio tiosolfato, nelle quantità indicate, non interferisce con i risultati delle analisi microbiologiche non avendo effetto sui microrganismi. In commercio sono comunque disponibili bottiglie sterili già contenenti il sodio tiosolfato in concentrazione idonea.

Le bottiglie/contenitori utilizzati per prelevare campioni per analisi microbiologiche non devono mai essere sciacquati all'atto del prelievo. Il risciacquo oltre ad esporre i recipienti a possibili contaminazioni, asporterebbe il sodio tiosolfato eventualmente presente.

Prelievi effettuati dai rubinetti per l'analisi di acque destinate al consumo umano devono essere effettuati secondo procedure che consentano di ottenere campioni rappresentativi.

I rubinetti devono essere disinfettati prima del campionamento. Eccezioni a questa pratica includono i casi in cui è necessario ottenere invece campioni per indagini epidemiologiche e che comunque devono fornire altri tipi di informazioni. I rubinetti devono essere detersi e devono essere eliminati depositi, mucillagini, sostanze grasse, detergenti o agenti disinfettanti che possono avere influenza sui

Versione on-line su sito www.iss.it

risultati dell'analisi microbiologica. Il collo all'interno del rubinetto può essere sede di biofilm che, per quanto possibile, vanno eliminati.

Per la pulizia deve essere eseguita una disinfezione con una soluzione di sodio ipoclorito o analoghi disinfettanti: possono essere utilizzate soluzioni al 10% di sodio ipoclorito commerciale o di sodio dicloroisocianurato. Per l'effetto corrosivo le soluzioni vanno utilizzate dagli operatori con particolari cautele. Se vengono in contatto con la pelle, lavare al momento con acqua.

Disinfettare il rubinetto esternamente ed internamente rimuovendo, se presenti, tubi e guarnizioni di plastica e gomma. I depositi di grasso devono essere rimossi strofinando con 2-propanolo.

Una volta lavato il rubinetto con la soluzione disinfettante, lasciare agire il disinfettante per 2-3 minuti. Sciacquare poi l'esterno con acqua per assicurarsi che non ci siano più residui di disinfettante. Aprire quindi il rubinetto e fare scorrere l'acqua per un tempo sufficiente a far sì che i disinfettanti vengano eliminati prima della raccolta del campione.

L'operazione di flambaggio del rubinetto, solo supplementare alla pulizia e disinfezione comunque obbligatorie, può essere effettuata solo su rubinetti metallici. Tuttavia, se effettuata in modo superficiale e fugace, non esplica alcun effetto sulla eventuale contaminazione microbica presente. Volendo procedere al flambaggio, per la produzione della fiamma utilizzare gas propano o butano che permettono sia di raggiungere temperature più elevate sia di controllare la fiamma per evitare danni a persone e cose.

Eseguire il prelievo dopo avere fatto scorrere dal rubinetto l'acqua per 1-3 minuti evitando di modificare la portata del flusso durante la raccolta del campione.

All'atto del prelievo, aprire la bottiglia sterile avendo cura di non toccare la parte interna del tappo che andrà a contatto con il campione prelevato, né l'interno del collo della bottiglia e provvedere all'immediata chiusura della stessa subito dopo il prelievo, avendo cura di non riempirla completamente al fine di consentire una efficace omogeneizzazione del campione, in laboratorio, al momento dell'analisi.

Anche le apparecchiature eventualmente necessarie per il campionamento devono risultare sterili, anche allo scopo di evitare fenomeni di contaminazione crociata. Se il prelievo viene effettuato per immersione, la bottiglia o il contenitore devono essere sterilizzati avvolti in fogli protettivi. All'atto del prelievo, dopo avere liberato dall'involucro la bottiglia, la superficie esterna che entrerà in contatto con il campione non deve mai essere toccata con le mani, bensì la bottiglia deve essere afferrata con una pinza sterile o con altro sistema idoneo. L'apparecchiatura più semplice per lo svolgimento del campionamento istantaneo a profondità predeterminata è rappresentata da flaconi zavorrati che, immersi chiusi nella massa di acqua, si aprono a comando alla profondità prestabilita.

Il campione prelevato deve essere accompagnato da tutte le indicazioni necessarie alla sua identificazione, quali la data e l'ora del campionamento, il tipo di acqua, la precisa annotazione del punto in cui è stato effettuato il prelievo e devono altresì essere trasmesse, con il campione, tutte le indicazioni concernenti le eventuali determinazioni effettuate in loco e qualunque altra osservazione possa risultare utile nella interpretazione dei risultati di laboratorio. A parte ogni esigenza di natura giuridica, che può prevedere precise modalità di identificazione del campione, è comunque necessario che il campione venga contrassegnato sia con il codice numerico, sia con l'indicazione in chiaro del punto di campionamento.

3. Trasporto e conservazione dei campioni

Durante il trasporto e la conservazione di campioni di acqua per l'analisi microbiologica è necessario mantenere la rappresentatività del campione impedendo il decadimento o la ricrescita dei microrganismi presenti. Per quanto possibile, si devono quindi limitare alterazioni che sono comunque inevitabili in un'aliquota ridotta di acqua. Le modifiche cui possono andare incontro campioni di acqua prelevati possono avere origine, non solo dalla condizione di spazio confinato in cui si ritrova il campione, ma anche da fattori fisici-chimici-biologici e dalla inosservanza dei tempi e/o delle modalità di trasporto.

Il campione deve essere protetto dalla luce (ultravioletta e visibile) e dalle alte temperature e trasportato in idonee condizioni igieniche

Versione on-line su sito www.iss.it

Tutti i campioni, dall'atto del prelievo sino all'arrivo in laboratorio, vanno conservati ad una temperatura inferiore a 10°; l'intervallo tra i 2° e gli 8° è quello consigliabile.

Al fine di consentire il mantenimento della temperatura è necessario usare contenitori termoisolanti che contengano piastre eutettiche evitando comunque il congelamento del campione (ad eccezione di campioni in cui sono da ricercare virus). Ma poiché il modo in cui è stato eseguito il trasporto deve poter essere certificato e documentato sarebbe opportuno disporre di frigoriferi portatili a batteria con termocoppie registranti la temperatura.

Tuttavia, nonostante la necessità di mantenere la temperatura dei campioni a $5\pm 3^\circ$, qualora le condizioni ambientali e quelle intrinseche del campione di acqua non lo consentano, si raccomanda di verificare che la temperatura di conservazione del campione non superi mai quella rilevata all'atto del prelievo.

Fermo restando che il tempo che intercorre tra prelievo e analisi dei campioni, indipendentemente dalla loro natura, deve essere il più breve possibile, nel caso di acque destinate al consumo umano, corre l'obbligo di non superare le 24 ore. Quando ciò non sia possibile, almeno per alcune indagini microbiologiche, sarebbe opportuno utilizzare idonei sistemi analitici portatili o laboratori mobili.

Nella tabella 1 sono comunque riportati, a scopo indicativo, i tempi raccomandati per la conservazione dei campioni per analisi microbiologiche in funzione dei diversi microrganismi da determinare.

Tabella 1 - Tempi massimi (accettabili) raccomandati per la conservazione dei campioni per analisi microbiologiche in funzione dei diversi microrganismi

Gruppi di organismi da ricercare	Tempo massimo (accettabile) in ore
Organismi vitali a 22° o 36°	8 (12)
<i>Escherichia coli</i> e coliformi	12 (18)
Enterococchi	12 (18)
Batteri e spore di Clostridi solfito-riduttori	48 (72)
Batteriofagi	48 (72)
<i>Salmonella</i> e altre Enterobatteriacee	12 (18)
Enterovirus	48 (72)
Cisti/oozisti di <i>Giardia/Cryptosporidium</i>	24 (48)
Amoebae	48 (72)
<i>Staphylococcus</i>	8 (12)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8 (12)
<i>Legionella</i>	24 (48)
Cianobatteri	48 (72)
<i>Campylobacter</i>	6 (8)
Uova di Elminti (a pH 2.0)	48 (72)