

DETERMINAZIONE DI CISTI DI *GIARDIA* ED OOCISTI DI *CRYPTOSPORIDIUM*

0. Generalità e definizioni

Nella nota 2 dell'Allegato I (parte C) del Decreto Legislativo n. 31 del 2 Febbraio 2001 è stabilito che qualora campioni di acqua che provengano o siano influenzati da acque superficiali risultino positivi per la presenza di *Clostridium perfringens* (spore compresse) l'autorità sanitaria debba verificare che non sussistano potenziali pericoli dovuti alla presenza di microrganismi patogeni quali, ad esempio, *Cryptosporidium*. Nel successivo Decreto Legislativo n. 27 del 2 Febbraio 2002 che apporta modifiche ed integrazioni al D. Lgs. n. 31 viene fissato un volume di riferimento pari a 100 L relativamente alla ricerca dei Protozoi.

Di seguito verranno descritti i metodi per la ricerca di cisti ed oocisti di protozoi patogeni, *Giardia* e *Cryptosporidium*, rispettivamente. La rilevanza, legata alla determinazione di protozoi parassiti nelle acque, nasce dalla considerazione che, negli anni più recenti, alcuni protozoi, ritenuti inizialmente agenti di zoonosi, acquistando capacità infettanti più ampie, sono stati anche riconosciuti come patogeni umani diretti e che l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha inserito, tra i patogeni emergenti di interesse prioritario, i protozoi patogeni *Giardia* e *Cryptosporidium*.

Giardia lamblia (o *intestinalis*) è un protozoo flagellato, riconosciuto come patogeno per l'uomo dalla metà degli anni '60. Ha un ciclo monoxeno che comprende lo stadio di trofozoite e quello di cisti. *Cryptosporidium parvum* è un protozoo coccide, riconosciuto come patogeno per l'uomo dal 1976. Tuttavia, altre specie appartenenti al genere, negli ultimi anni, si sono manifestate come patogeni umani. Anche *Cryptosporidium* ha un ciclo monoxeno, nel quale la riproduzione sessuata ed asessuata si compiono nello stesso ospite; attraverso una serie di stadi si produce l'oociste, forma di resistenza nell'ambiente e infettiva nell'uomo e negli animali.

Le cisti di *Giardia* e le oocisti di *Cryptosporidium* sono gli stadi infettanti e vengono introdotte nell'ambiente con le feci dai serbatoi di infezione che possono essere rappresentati dall'uomo, ma anche da numerosi animali sia selvatici, sia di allevamento sia domestici. La diffusione delle cisti e delle oocisti nell'ambiente è favorita dalla scarsa specificità d'ospite di questi parassiti, nonché dalla notevole resistenza di queste strutture agli stress ambientali.

Giardiasi e criptosporidiosi sono patologie a trasmissione fecale-orale, che possono trascorrere in forma asintomatica o determinare una gastroenterite autorisolvibile nei soggetti immunocompetenti. Negli immunodepressi, in modo particolare nei malati di AIDS, invece, soprattutto l'infezione da *Cryptosporidium*, può cronicizzare, provocando una diarrea persistente, con conseguenze gravi, che possono arrivare sino alla morte.

Le modalità d'infezione, per entrambi i parassiti, sono rappresentate dal consumo di acqua o di alimenti contaminati, dal contatto interpersonale e con animali che fungono da serbatoi. Tuttavia, l'acqua è stata riconosciuta come il principale veicolo di trasmissione per questi parassiti, la cui presenza è stata rilevata sia nelle acque grezze, soprattutto di origine superficiale, sia nelle acque potabilizzate. Infatti, le acque superficiali possono subire facilmente una contaminazione attraverso gli scarichi di reflui civili o di allevamenti, il dilavamento del terreno e la fertirrigazione. E' nota, d'altra parte, la resistenza delle cisti e delle oocisti agli stress ambientali e ai trattamenti chimico-fisici comunemente attuati nei processi di potabilizzazione che non riescono quindi a garantire la rimozione dei parassiti da acque contaminate.

1. Campo di applicazione

Le procedure analitiche vengono utilizzate per le acque sorgive, sotterranee e superficiali, destinate o da destinare al consumo.

Possono essere utilizzate per valutare la eventuale presenza e distribuzione di protozoi nelle riserve idriche, per individuare la sorgente di contaminazione e per analizzare l'efficienza del trattamento di potabilizzazione.

Di seguito vengono descritti due metodi idonei alla ricerca di cisti e oocisti in acque destinate al consumo umano che contengano basse concentrazioni di solidi sospesi.

I metodi consentono di quantificare, se presenti, il numero delle cisti e delle oocisti.

Sono anche descritte alcune tecniche molecolari (PCR, RT-PCR), utilizzate come prove di conferma.

2. Metodi di analisi

2.1. Metodo 1

2.1.1. Principio del metodo

Prevede la filtrazione su capsula, porosità nominale 1 μm , di campioni d'acqua, l'eluizione delle cisti ed oocisti con una soluzione di lavaggio, la concentrazione e la purificazione dell'eluato tramite centrifugazione e flottazione/immunoseparazione, la determinazione e il conteggio al microscopio delle cisti ed oocisti mediante immunofluorescenza diretta. L'efficienza di recupero del metodo prima della fase di chiarificazione varia dal 20 al 35% per *Cryptosporidium* e dal 45 al 95% per *Giardia*.

Prove di conferma molecolare possono essere effettuate mediante reazioni di PCR e nested PCR (2.3.), mentre informazioni sullo stato di vitalità possono essere acquisite mediante la reazione di RT-PCR (2.5.).

2.1.2. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi, oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio (v. Appendice 1), è necessario disporre di:

- agitatore con braccetti;
- agitatore ruotante Sample Mixer MX-1 (Dynal);
- apparato di filtrazione per filtri a membrana da 25 mm di diametro;
- camera umida;
- centrifuga refrigerata (intorno a +4°) 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;
- dispositivo magnetico MPC-1 per provetta L10 con parete piatta (Dynal);
- dispositivo magnetico MPC-S per provette da 1,5 mL (Dynal);
- filtro a capsula in polietersolfone, (1 μm di porosità, 6 cm di diametro, 21 cm di lunghezza, 1300 cm^2 di superficie) per volumi di acqua inferiori ai 50 litri di acqua grezza; filtro a capsula in poliestere (1 μm di porosità, 6 cm di diametro, 21 cm di lunghezza, 1300 cm^2 di superficie) per volumi di acqua superiori ai 50 litri di acqua grezza o fino a 1000 litri di acqua potabile;
- membrane di policarbonato, 1,2 μm di porosità, 25 mm di diametro;
- microscopio ad epifluorescenza con filtri per l'FITC (filtri di eccitazione 450-490 nm, filtro barriera 515-520 nm) e per gli UV (filtro di eccitazione 340-380 nm, filtro barriera 420 nm), obiettivi 20, 40 e 100x ed oculare con micrometro lineare. E' necessario disporre del contrasto di fase e qualora possibile del contrasto ad interferenza differenziale (DIC) per l'obiettivo 100x;
- pipette da 1,10,25 mL;
- pipettatrice automatica;
- pompa aspirante con portata intorno ai 14 L/min;
- provette L10 con parete piatta (Dynal);
- regolatore di flusso;

- tubi semirigidi di connessione con relativi raccordi e fascette;
- vetrini a pozzetto (compresi nel kit per l'immunofluorescenza);
- vetrini a pozzetto Spot-on (Dynal);
- vortex.

2.1.3. Volume da campionare

Questo metodo consente di campionare volumi variabili d'acqua (10-1000 L) in relazione alla torbidità, usando eventualmente tipologie diverse di cartucce (polietersulfone oppure poliestere) oppure aumentandone il numero per filtrare il volume appropriato. Nel caso in cui l'acqua sia clorata aggiungere tiosolfato di sodio (2.1.4.1.) (250 mL di tiosolfato di sodio al 2% ogni 100 L di campione).

2.1.4. Reagenti

2.1.4.1. Soluzione di tiosolfato di sodio al 2%

Composizione	
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	2 g
Acqua distillata	100 mL

Sciogliere la polvere in 100 mL di acqua distillata. Sterilizzare in autoclave per 15 min a $121 \pm 3^\circ$.

2.1.4.2. Soluzione di PBS (Phosphate Buffer Saline) 10x

Composizione	
NaCl	80 g
KH_2PO_4	2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	29 g
KCl	2 g
Acqua distillata	

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata. Aggiustare il pH a $7,2 \pm 0,2$ con NaOH 0,1 N o HCl 0,1 N. Sterilizzare in autoclave per 15 min a $121 \pm 3^\circ$.

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

2.1.4.3. Soluzione di PBS 1x

Composizione	
PBS 10x	100 mL
Acqua distillata	900 mL

Mescolare i due componenti.

2.1.4.4. Soluzione di Idrossido di sodio (NaOH) 0,1 N

Composizione	
NaOH	0,4 g
Acqua distillata	100 mL

Sciogliere su agitatore magnetico.

2.1.4.5. Soluzione di Acido cloridrico (HCl) 0,1 N

Composizione	
HCl 37%	0,82 mL
Acqua distillata	100 mL

Sciogliere con acqua distillata.

2.1.4.6. Tampone per eluizione

Composizione	
Laureth 12	1 g
Tris-HCl 1M, pH 7,4	10 mL
EDTANa ₂ 0,5 M, pH 8	2 mL
Antischiuma A	150 µL
Acqua distillata	

Pesare il Laureth 12 in un beaker di vetro pirex e aggiungere 100 mL di acqua distillata. Scaldare su una piastra o in un forno a microonde per consentire al Laureth 12 di sciogliersi. Trasferire la soluzione in un matraccio da 1 L.

Sciacquare il beaker numerose volte e mettere l'acqua di risciacquo nel matraccio. Aggiungere gli altri reattivi. Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

2.1.4.7. Tris-HCl 1 M, pH 7,4

Composizione	
Tris	121,1 g
Acqua distillata	

Sciogliere il Tris nell'acqua e portare a pH 7,4±0,2 con HCl o NaOH 0,1 N.

Portare a volume finale di 1L con acqua distillata.

Sterilizzare con un filtro a membrana da 0,22 µm; conservare in un contenitore di plastica a temperatura ambiente.

2.1.4.8. EDTANa₂ 0,5 M, pH 8

Composizione	
EDTANa ₂ 2 H ₂ O	186,1 g
Acqua distillata	

Sciogliere l'EDTANa₂ nell'acqua e portare a pH 8±0,2 con HCl o NaOH 0,1 N. Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

2.1.4.9. Soluzione di Percoll-Saccarosio 1 (100 mL)

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.

Tutta la procedura deve essere svolta mantenendo i reattivi a 5±3°.

2.1.4.10. Soluzione di Percoll-Saccarosio 2 (30 mL)

Composizione	
Percoll (densità=1,13)	15,9 mL
Saccarosio 2,5 M	14,1 mL

Mescolare i componenti e controllare che la densità sia tra 1,09-1,1 con un idrometro. Tutta la procedura deve essere svolta mantenendo i reattivi a $5\pm 3^\circ$.

2.1.4.11. Soluzione di Saccarosio 2,5 M

Composizione	
Saccarosio	855,8 g
Acqua distillata	400 mL

Far sciogliere il saccarosio nell'acqua distillata preriscaldata. Raffreddare e portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

2.1.4.12. Soluzione di lavaggio A

Composizione	
PBS 10x	100 mL
Tween-80	1 ml
Sodio Dodecil Solfato (SDS)	1 g
Antischiuma B	500 μ L
Acqua distillata	

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

2.1.4.13. Soluzione di lavaggio B

Composizione	
PBS 10x	100 mL
Tween-20	0,5 mL
Acqua distillata	

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

2.1.4.14. Kit per immunoseparazione (Dynal)

Componenti
Soluzione di microsferi (dynabeads) coniugate con anticorpi anti- <i>Cryptosporidium</i> ;
Soluzione di microsferi (dynabeads) coniugate con anticorpi anti- <i>Giardia</i> ;
Tampone A 10x SL TM ;
Tampone B10x SL TM .

Conservare i componenti tra 0-8°.

2.1.4.15. Kit per la determinazione di oocisti e di cisti mediante immunofluorescenza diretta

Componenti
Anticorpi monoclonali anti- <i>Cryptosporidium</i> coniugati

con Isotiocianato di Fluoresceina; Anticorpi monoclonali anti- <i>Giardia</i> coniugati con Isotiocianato di Fluoresceina; Controllo positivo; Controllo negativo; Tampone di lavaggio; Soluzione di montaggio (Mounting Medium)
--

Conservare i componenti tra 0-8°, protetti dalla luce.

2.1.4.16. Soluzione stock DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole)

Composizione	
DAPI	2 mg
Metanolo	1 mL

Poiché la soluzione si conserva al buio tra 0 e 8° per due settimane, è opportuno preparare il volume minimo di soluzione necessario per l'uso.

2.1.4.17. Soluzione di colorazione DAPI-PBS (0,4 µg DAPI/mL PBS)

Composizione	
soluzione stock DAPI	10 µL
PBS 1x	50 mL

La soluzione deve essere preparata giornalmente e mantenuta al buio tra 0 e 8°. La concentrazione della soluzione può essere incrementata fino ad 1 µg/mL se si osserva un decremento della colorazione.

2.1.5. Procedura

2.1.5.1. Campionamento

Il campionamento può essere effettuato secondo lo schema riportato in figura 2 ponendo la pompa e gli altri accessori a valle della capsula oppure ponendo la pompa a monte oppure utilizzando un sistema in pressione (rubinetto). Il flusso deve essere intorno a 2 L/min. Prima di iniziare il campionamento e montare quindi la capsula, è importante far passare attraverso il sistema dai 100 ai 200 L di acqua. Inserire poi la capsula dopo aver rimosso e tenuto da parte i tappi che proteggono le due estremità della capsula.

Dopo aver avviato la pompa aprire la valvola di sfiato della capsula girandola in senso orario, permettendo così all'aria di uscire dalla capsula. Effettuare il campionamento.

Quando tutto il campione è stato raccolto rimuovere l'entrata del tubo dalla fonte d'acqua e consentire alla pompa di pompare il resto dell'acqua rimasta nel tubo dentro la capsula. Staccare il tubo di uscita eappare l'estremità di uscita della capsula, quindi staccare l'altra estremità facendo attenzione a non perdere l'acqua rimasta nella capsula e tapparla. In ogni caso, il campionamento deve considerarsi concluso quando il flusso viene ridotto in conseguenza dell'intasamento della capsula. Trasportare la capsula in condizioni refrigerate in laboratorio.

2.1.5.2. Eluizione della capsula

Per ogni capsula sono necessari 240 mL di tampone per eluizione (2.1.4.6.).

Se l'acqua rimasta nella capsula riempie meno della metà della cartuccia, mantenerla nella cartuccia e procedere con l'eluizione. Se l'acqua rimasta nella capsula riempie più della metà della cartuccia, svuotarla in un contenitore e tenerla da parte come parte del campione.

Aggiungere 120 mL di tampone per eluizione (2.1.4.6.) con un cilindro graduato attraverso l'estremità di entrata della capsula. Inserire la capsula nell'agitatore con il lato di ingresso posto in modo che la valvola di sfiato sia posizionata a ore 12 e procedere all'agitazione per 5 minuti a 600 rpm. Versare l'eluato in un tubo da centrifuga.

Per la capsula in polietersulfone, aggiungere gli altri 120 mL di tampone per eluizione (2.1.4.6.) con un cilindro graduato attraverso l'estremità di entrata della capsula. Inserire la capsula nell'agitatore con il lato di ingresso posto in modo che la valvola di sfiato sia posizionata a ore 9 e procedere all'agitazione per 5 minuti a 600 rpm.

Miscelare l'eluato con il precedente ed aggiungere l'eventuale residuo d'acqua tenuto da parte.

Per la capsula in poliestere, aggiungere gli altri 120 mL di tampone per eluizione (2.1.4.6.) con un cilindro graduato attraverso l'estremità di entrata della capsula. Inserire la capsula nell'agitatore con il lato di ingresso posto in modo che la valvola di sfiato sia posizionata a ore 4 e procedere all'agitazione per 5 minuti a 600 rpm. Senza rimuovere la capsula dall'agitatore, ruotarla in modo che la valvola di sfiato sia posizionata a ore 8 e procedere all'agitazione per 5 minuti a 600 rpm.

Miscelare l'eluato con il precedente ed aggiungere l'eventuale residuo d'acqua tenuto da parte.

Centrifugare a 1100 x g per 10 minuti, decelerare lentamente senza usare il freno. Eliminare con delicatezza il surnatante. Misurare il volume del campione concentrato.

Qualora il procedimento di concentrazione avesse portato ad un campione finale di eccessiva torbidità per un'analisi diretta al microscopio a fluorescenza, si procede alla chiarificazione del campione (2.1.5.3.).

2.1.5.3. Chiarificazione

- Chiarificazione mediante flottazione su cuscino di Percoll Saccarosio

Preparare 30 mL di soluzione Percoll-Saccarosio per ogni campione. Questa soluzione può essere preparata secondo due metodi diversi.

Utilizzare la soluzione di Percoll-Saccarosio 1 (2.1.4.9.) e procedere nel seguente modo.

Prendere 0,5 mL di campione concentrato (dal volume totale di 1-50 mL) e aggiungere 19,5 mL di soluzione di lavaggio A (2.1.4.12.) utilizzata per eluire la cartuccia. Mettere, in una provetta da 50 mL, 20 mL di campione e iniettare sul fondo 30 mL di soluzione di Percoll-Saccarosio 1, facendo attenzione a non rompere l'interfaccia tra le due componenti.

Utilizzare la soluzione di Percoll-Saccarosio 2 (2.1.4.10.) e procedere nel seguente modo.

Prendere 1 mL di campione concentrato dal volume finale (1-50 mL) e aggiungere 19 mL di soluzione di lavaggio A (2.1.4.12.) utilizzata inizialmente per eluire la cartuccia. Mettere la soluzione di Percoll-Saccarosio 2 (30 mL) in una provetta da 50 mL e stratificare sulla superficie 20 mL di campione.

In entrambi i casi centrifugare a 1050 x g per 10 min a $5\pm 3^\circ$ accelerando lentamente e senza usare il freno alla fine della centrifugazione.

Prelevare con cura il supernatante, l'interfaccia e circa 5 mL di Percoll-Saccarosio (per un totale di circa 25 mL) e raccogliarlo in una provetta da 50 mL.

Introdurre nella provetta contenente il campione chiarificato la soluzione di lavaggio B (2.1.4.13.) fino a raggiungere il volume di 50 mL, mescolare con vortex e centrifugare a 1050 x g per 15 min.

Aspirare il supernatante e raccogliere il pellet (1-5 mL).

E' opportuno includere tra i campioni da sottoporre a purificazione alcuni controlli positivi a concentrazione nota di cisti e oocisti, che, processati contemporaneamente, consentono una più precisa valutazione di efficienza di recupero del metodo.

- Chiarificazione mediante separazione immunomagnetica

La metodica prevede che le cisti di *Giardia* e le oocisti di *Cryptosporidium* siano isolate da campioni concentrati di acqua mediante l'utilizzo di microsferi uniformi, monodisperse, superparamagnetiche, coniugate covalentemente con anticorpi anti-cisti di *Giardia* e anti-oocisti di *Cryptosporidium* (2.1.4.14.). I complessi microsferi-cisti/oocisti vengono separati mediante l'applicazione di un campo magnetico; le cisti/oocisti vengono successivamente dissociate dalle microsferi così da ottenere un volume ridotto di una sospensione finale limpida da analizzare mediante immunofluorescenza diretta.

L'efficienza di recupero di cisti e oocisti varia dal 60 al 95% se, relativamente al particolato presente nell'acqua, sono rispettati i limiti indicati. E' inoltre opportuno includere tra i campioni da sottoporre a purificazione alcuni controlli positivi a concentrazione nota di cisti e oocisti, che, processati contemporaneamente, consentono una più precisa valutazione di efficienza di recupero del metodo.

La quantità di materiale particolato presente in 10 mL di campione concentrato deve essere inferiore a 0,5 mL, altrimenti il campione deve essere diluito e diviso in più aliquote prima di procedere alla chiarificazione.

Trasferire 10 mL di campione in un'apposita provetta con parete piatta e aggiungere 1mL di tampone A 10x SL™ (2.1.4.14.), 1 mL di tampone B 10x SL™ (2.1.4.14.), 100 µL della sospensione di microsferi anti-*Cryptosporidium* (2.1.4.14.) e 100 µL della sospensione di microsferi anti-*Giardia* (2.1.4.14.) (le sospensioni di microsferi devono essere agitate vigorosamente mediante vortex immediatamente prima di essere usate). Incubare il campione in agitazione-rotazione nell'agitatore ruotante Sample Mixer MX-1 a 18 rpm, a temperatura ambiente per un'ora. Inserire la provetta nel dispositivo MPC-1 con la parete piatta rivolta verso il magnete e ruotare il dispositivo manualmente e delicatamente in modo da effettuare una rotazione di 90° ogni secondo per la durata di due minuti. Durante questa fase i complessi microsferi-cisti ed oocisti aderiscono alla parete della provetta esposta al magnete. Senza rimuovere la provetta dal dispositivo, eliminare il supernatante capovolgendo il dispositivo stesso. Togliere la provetta dal dispositivo magnetico e risospendere il campione in 1 mL di tampone A 1X. Trasferire la soluzione in una provetta da 1,5 mL ed inserire quest'ultima nell'apposito dispositivo MPC-S con la parete magnetica inserita. Agitare manualmente il campione ruotando il dispositivo in modo da compiere un movimento di 90° al secondo per la durata di un minuto. Aspirare immediatamente il supernatante, facendo attenzione a non rimuovere anche i complessi microsferi cisti/oocisti. Rimuovere la barra magnetica e risospendere il campione in 100 µL di HCl 0,1 N; agitare per 5 secondi mediante vortex e lasciare riposare a temperatura ambiente per 10 minuti nel portaprovette MPC-M (senza parete magnetica). Dopo ulteriore agitazione mediante vortex per 5 secondi, reinserire i campioni nel portaprovette MPC-M, reintrodurre la parete magnetica nel dispositivo stesso e attendere 10 secondi. Senza togliere la provetta dal dispositivo magnetico, prelevare 50µL di supernatante e trasferli su un vetrino a pozzetto Dynal Spot-on su cui sono stati posti 5 µL di NaOH 1 N. Il vetrino è lasciato all'aria ad asciugare e, una volta asciutto, il campione è fissato depositando nel pozzetto 50 µL di metanolo e lasciando evaporare all'aria. Si procede quindi alla identificazione per immunofluorescenza diretta (2.1.5.4.).

Trasferire i rimanenti 50 µL in una provetta da 1,5 mL e aggiungere 5 µL di NaOH 1 N. Questa aliquota di campione potrà essere utilizzata qualora si ritenga opportuno procedere a prove di conferma molecolare mediante PCR, oppure potrà essere analizzata per immunofluorescenza in un secondo tempo.

2.1.5.4. Determinazione mediante immunofluorescenza diretta

Principio: si usano anticorpi monoclonali di topo anti-cisti di *Giardia* e anti-oocisti di *Cryptosporidium* coniugati con FITC, che si legano ad antigeni presenti sulle pareti.

- Procedimento su vetrino a pozzetto

Portare i reattivi del kit (2.1.4.15.) a temperatura ambiente. Trasferire 10-50 μL di campione in un pozzetto.

Trasferire 10 μL del controllo positivo in un pozzetto e 10 μL del controllo negativo in un altro.

Asciugare a temperatura ambiente o più rapidamente in stufa a $37\pm 1^\circ$. Fissare ciascun campione secondo le modalità indicate dalla ditta produttrice del kit. Mettere 20-50 μL di anticorpo su ciascun pozzetto ed incubare il vetrino in camera umida, al buio, a temperatura ambiente per 30 minuti. Aspirare l'eccesso di anticorpo con una pompa Venturi usando una pipetta con punta molto fine. Lavare il vetrino con molta cautela usando il tampone di lavaggio fornito dal kit o PBS 1x. Porre 100 μL della soluzione di colorazione DAPI-PBS (2.1.4.17.) nel pozzetto e lasciare incubare a $37\pm 1^\circ$ al buio per 15 minuti. Eseguire altri due lavaggi con PBS 1x (2.1.4.3.) e acqua distillata. Asciugare il vetrino a $37\pm 1^\circ$. Montare il vetrino coprioggetto con una goccia di soluzione di montaggio, facendo attenzione a non formare bolle.

Procedimento su filtro

Portare tutti i reattivi del kit (2.1.4.15.) a temperatura ambiente. Preparare la membrana (porosità 1,2 μm , in policarbonato, di diametro 25 mm) bagnandola con PBS 1x; porre la membrana sul supporto di filtrazione. Filtrare 1 mL di campione. Evitare che il campione posto sulla membrana vada a secco durante tutti i passaggi.

Aggiungere una goccia di anticorpi fluoresceinati. Incubare a $37\pm 1^\circ$ per 30 min. Filtrare, quindi lavare una volta la membrana con PBS 1x (2.1.4.3.) aggiungendone 3 mL e filtrando. Successivamente porre 100 μL della soluzione di colorazione del DAPI (2.1.4.17.) e lasciare incubare a $37\pm 1^\circ$ per 15 minuti. Effettuare altri 2 lavaggi con PBS 1x (2.1.4.3.). Eliminare ogni traccia di liquido mediante filtrazione.

Porre una goccia di liquido di montaggio su un vetrino, farvi aderire la membrana, quindi montare il vetrino coprioggetto con il liquido di montaggio.

2.1.5.5. Esame microscopico

Osservare al microscopio tutto il vetrino 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* (diametro 3,5-6,5 μm), utilizzando un micrometro lineare ed effettuando dei confronti con un controllo positivo. Segnare le coordinate del vetrino dove sono state rinvenute le cisti e le oocisti. Questa valutazione consente di fornire una determinazione presuntiva delle cisti ed oocisti.

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). Con il contrasto di fase è possibile distinguere le cisti ed oocisti piene da quelle vuote e, quindi, dare un'ulteriore indicazione sulla presunta vitalità delle cisti ed oocisti piene. Con il microscopio a contrasto interferenziale è invece possibile valutare la presenza di strutture interne (nuclei, corpi mediani, spazio peritrofico nella *Giardia*; sporozoi e granuli residui nel *Cryptosporidium*), valutazioni che consentono sia di confermare la determinazione, sia di dare una ulteriore indicazione in merito alla condizione delle cisti ed oocisti: si possono distinguere, infatti, cisti ed oocisti vuote, contenenti strutture amorfe oppure contenenti strutture caratteristiche ben conservate.

Effettuata questa valutazione, registrare il conteggio totale di cisti di *Giardia* e di oocisti di *Cryptosporidium*.

Se è stata effettuata anche la valutazione con il contrasto di fase annotare il numero di cisti ed oocisti che risultano piene o vuote.

Se è stata effettuata anche la valutazione con il DIC annotare il numero di cisti ed oocisti vuote, con contenuto amorfo o con strutture interne.

Per effettuare le valutazioni al contrasto di fase o con il DIC è consigliabile utilizzare la tecnica di immunofluorescenza su vetrino a pozzetto perché questa condizione consente una maggiore trasparenza.

Per effettuare la valutazione di vitalità mediante la colorazione con il DAPI è consigliabile effettuare la lettura con l'obiettivo 100 × e l'apposito filtro ad UV. Vengono considerate vitali le cisti e le oocisti contenenti nuclei colorati in blu.

2.1.5.6. Interpretazione dei risultati

Ogni campione che presenta una o più strutture tipiche assimilabili a cisti di *Giardia* o oocisti di *Cryptosporidium* per fluorescenza, forma e dimensioni può essere considerato presuntivamente un campione positivo.

La torbidità, il particolato organico ed inorganico del campione d'acqua possono interferire con il recupero delle cisti ed oocisti nella fase di concentrazione e purificazione e con la determinazione delle strutture al microscopio.

Organismi (alghe e lieviti) e detriti autofluorescenti possono interferire durante la determinazione al microscopio a epifluorescenza e causare la registrazione di falsi positivi.

Le sostanze utilizzate nella disinfezione possono determinare delle interferenze nella individuazione delle strutture interne alle cisti ed oocisti perché possono causarne la parziale distruzione o trasformazione in strutture amorfe e pertanto irricognoscibili.

2.1.5.7. Espressione dei risultati

Il numero di cisti ed oocisti contate sull'intera superficie di ciascun pozzetto si riferisce al volume di campione ivi depositato. Tale numero deve essere rapportato al volume totale di supernatante derivante dalla chiarificazione e al volume di eluato sottoposto a chiarificazione; tale numero viene quindi rapportato al volume totale del campione eluato e infine rapportato al numero di litri di campione filtrati.

2.2. Metodo 2

2.2.1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla filtrazione di volumi noti di acqua, attraverso filtri costituiti da dischi di schiuma compressa, sulla eluizione dei dischi stessi mediante ripetuti movimenti di compressione e decompressione in un tampone eluente e sulla concentrazione dell'eluato mediante aspirazione con pompa da vuoto. Il concentrato è successivamente sottoposto a chiarificazione mediante flottazione su cuscino di saccarosio o mediante immunoseparazione. Il rilevamento delle cisti di *Giardia* e delle oocisti di *Cryptosporidium* avviene per analisi microscopica del campione mediante immunofluorescenza diretta.

L'efficienza di recupero del metodo prima della fase di chiarificazione varia dal 60 al 90% per entrambi i parassiti.

Prove di conferma molecolare possono essere effettuate mediante reazioni di PCR e nested PCR (2.3.), mentre informazioni sullo stato di vitalità possono essere acquisite mediante la reazione di RT-PCR (2.5.).

2.2.2. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi, oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio (v. Appendice 1), è necessario disporre di:

- Filta-Max Automatic Wash Station (IDEXX) completa di equipaggiamento (alloggiamento per il filtro, macchina, stantuffo, tubo di eluizione, tubo di concentrazione, base del tubo di

- concentrazione, coperchio con barra magnetica, chiave di Allen, tubo di acciaio, tappini di gomma, bustine di nylon, guarnizioni O-ring);
- moduli filtranti Filta- Max (dischi di schiuma compressa, IDEXX), porosità nominale 1 µm;
 - membrane di nitrato di cellulosa, 73mm di diametro, 3 µm di porosità (IDEXX);
 - piastra magnetica;
 - pinzette;
 - pompa da vuoto manuale.

2.2.3. Volume da campionare

I volumi di acqua da campionare mediante filtrazione sono variabili in relazione alla loro origine e alla loro torbidità. Il metodo consente di filtrare fino a 1000 litri di acqua potabile e 50 litri di acqua reflua, concentrando il campione ad un volume finale di circa 25 mL.

2.2.4. Reagenti

2.2.4.1. Soluzione di PBS - Tween 20 (Phosphatase Buffer- Saline - 0,01% Tween 20) 10X (PBST 10X)

Composizione		
Cloruro di sodio NaCl	80	g
Fosfato di potassio monobasico (KH ₂ PO ₄)	2	g
Fosfato di sodio bibasico dodecaidrato (Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O)	29	g
Cloruro di potassio (KCl)	2	g
Tween 20	100	µL
Acqua distillata		

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

2.2.4.2. Soluzione di PBS - Tween 20 1x (PBST 1X)

Composizione	
Soluz. di PBS - Tween 20 10x	100 mL
Acqua distillata	

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata. Sterilizzare in autoclave per 15 min a 121±3°.

2.2.4.3. Soluzione di Percoll-Saccarosio 1 (100 mL) (2.1.4.9.)

2.2.4.4. Soluzione di Percoll-Saccarosio 2 (30 mL) (2.1.4.10.)

2.2.4.5. Soluzione di Saccarosio 2,5 M (2.1.4.11.)

2.2.4.6. Soluzione di lavaggio A (2.1.4.12.)

2.2.4.7. Soluzione di lavaggio B (2.1.4.13.)

2.2.4.8. Kit per immunoseparazione (Dynal) (2.1.4.14.)

2.2.4.9. Kit per la determinazione di oocisti e di cisti mediante immunofluorescenza diretta (2.1.4.15.)

2.2.4.10. Soluzione stock DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole) (2.1.4.16.)

2.2.4.11. Soluzione di colorazione DAPI-PBS (0,4 µg DAPI/mL PBS) (2.1.4.17)

2.2.5. Procedura

2.2.5.1. Campionamento e volume da analizzare

Posizionare il modulo filtrante Filta-Max nel suo alloggiamento di filtrazione con la vite rivolta verso il coperchio. Avvitare il coperchio. Collegare l'estremità di entrata dell'alloggiamento di filtrazione all'estremità di uscita della pompa in modo che il flusso sia rivolto dal coperchio all'estremità opposta dell'alloggiamento. Collegare l'estremità di uscita di quest'ultimo al contalitri. E' richiesta una pressione di circa 5 bar per produrre il massimo flusso consentito pari a 3-4/L al minuto e, in ogni caso la pressione non deve mai eccedere gli 8 bar. Una volta completata la procedura di filtrazione,appare le estremità dell'alloggiamento di filtrazione con gli appositi tappini e trasportare in laboratorio in condizioni refrigerate.

2.2.5.2. Eluizione del filtro

- Primo lavaggio

Rimuovere il modulo filtrante dalla camera di alloggiamento, conservare l'acqua residua eventualmente contenuta come parte del campione e procedere al risciacquo della camera stessa; unire l'acqua di risciacquo a quella residua.

Porre una membrana di 73 mm di diametro e 3 µm di porosità sulla base del tubo di concentrazione con il lato rugoso rivolto all'insù. Avvitare il tubo di concentrazione alla sua base e versarvi l'eventuale campione residuo ed il liquido di risciacquo della camera di alloggiamento.

Applicare del silicone lubrificante sulla guarnizione O-ring posta all'esterno dello stantuffo (plunger) nel dispositivo Wash Station. Accendere la Wash Station. Premere F1 per posizionare lo stantuffo nella posizione di partenza. Avvitare il modulo filtrante all'estremità dello stantuffo mediante l'apposita vite. Far scorrere il tubo di eluizione attorno allo stantuffo e fissarne la base alle apposite ganasce sulla Wash Station.

Premere il tasto F1 per abbassare lo stantuffo. Inserire la chiave di Allen nel foro posto sotto la base del tubo di eluizione e rimuovere la vite dal modulo filtrante. Avvitare il tubo di acciaio (senza il tappino di gomma) alla base del tubo di eluizione. Versare 600 mL di PBST 1x

(2.2.4.2.) nel tubo di concentrazione assemblato alla sua base e posizionarlo al di sotto del tubo di eluizione utilizzando l'apposita ganascia. Premere il tasto F1 per il prelavaggio. Premere il tasto F3 per il primo lavaggio (lo stantuffo effettua 20 movimenti verticali di compressione e decompressione del filtro). Staccare il tubo di concentrazione assemblato alla sua base dalle ganasce e tenerlo con le mani al di sotto del tubo di acciaio per consentire la procedura di scolo (spurgo). Premere il tasto F4 per la procedura di scolo. Chiudere l'estremità del tubo di acciaio con il tappino di gomma.

- Prima fase di concentrazione

Chiudere il tubo di concentrazione assemblato alla sua base con il coperchio dotato di barra magnetica e posizionarlo su una piastra magnetica. Connettere il tubo di concentrazione ad una pompa da vuoto manuale per ridurre la fase liquida e ad una bottiglia di plastica usata come trappola. Aprire il rubinetto alla base del tubo di concentrazione ed azionare la pompa evitando di superare una pressione di 30 mm di Hg. Aspirare il liquido evitando che la membrana vada a secco. Le cisti e le oocisti dovrebbero rimanere sospese nel liquido al di sopra della membrana la cui funzione è quella di consentire la riduzione del volume d'acqua. Staccare la pompa, rimuovere il coperchio con la barra magnetica e sciacquare la barra con acqua distillata, scolandola nel tubo concentrazione. Travasare il liquido concentrato in una provetta da 50 mL. Sciacquare il tubo di concentrazione con acqua distillata ed aggiungerla nella provetta. Con l'ausilio di pinzette, togliere la membrana dalla base del tubo concentrazione e conservarla nell'apposita bustina di nylon. Qualora per l'elevata torbidità del campione, non fosse possibile concentrare il liquido mediante utilizzo di una sola membrana, procedere alla sostituzione di questa con altre membrane conservando ciascuna in una bustina (nel caso specifico le membrane possono essere posizionate nella base del tubo di concentrazione con il lato liscio all'insù).

- Secondo lavaggio

Togliere il tappino dall'estremità del tubo di acciaio, versare 600 mL di PBST 1x (2.2.4.2.) nel tubo di concentrazione e posizionare questo al di sotto del tubo di eluizione utilizzando l'apposita ganascia.

Premere il tasto F3 per il secondo lavaggio (lo stantuffo effettua 10 movimenti verticali di compressione e decompressione del filtro). Staccare il tubo di concentrazione assemblato alla sua base dalle ganasce e tenerlo con le mani al di sotto del tubo di acciaio per consentire la procedura di scolo (spurgo). Premere il tasto F4 per la procedura di scolo. Chiudere l'estremità del tubo di acciaio con il tappino di gomma. Aggiungere il campione concentrato derivante dal primo lavaggio ai 600 mL di eluato provenienti dal secondo.

- Seconda fase di concentrazione

Chiudere nuovamente il tubo di concentrazione assemblato alla sua base con il coperchio dotato di barra magnetica, posizionarlo sulla piastra magnetica e sottoporre ad agitazione. Connettere il tubo di concentrazione alla pompa da vuoto e alla bottiglia di plastica usata come trappola e procedere come descritto sopra per la prima fase di concentrazione. Non rimuovere completamente tutto il liquido ma arrestare il processo di concentrazione quando il livello del liquido nel tubo di concentrazione è tale che il magnete sia per metà ancora immerso nel liquido stesso.

Staccare la pompa, rimuovere il coperchio con la barra magnetica e sciacquare la barra con acqua distillata, scolandola nel tubo di concentrazione. Travasare il liquido concentrato in una provetta da 50 mL. Sciacquare il tubo di concentrazione con acqua distillata ed aggiungerla nella provetta. Con l'ausilio di pinzette, togliere la membrana dalla base del tubo di concentrazione e conservarla in una bustina di nylon.

Aggiungere 5 mL di PBST 1x (2.2.4.2.) in una delle bustine contenenti le membrane e, mantenendola chiusa, strofinare la superficie facendola scorrere tra le dita per circa un minuto. Con una pipetta rimuovere il liquido e aggiungerlo nella provetta contenente il campione concentrato. Trasferire le altre membrane, una alla volta, nella bustina in cui era contenuta la

prima e procedere alla loro eluizione con le stesse modalità. Complessivamente il volume del liquido concentrato dovrebbe essere pari a circa 20-30 mL. Procedere con la fase di chiarificazione (2.1.5.3).

2.2.6. Chiarificazione (2.1.5.3.)

2.2.7. Determinazione mediante immunofluorescenza diretta (2.1.5.4.)

2.2.8. Esame microscopico (2.1.5.5.)

2.2.9 Interpretazione dei risultati (2.1.5.6.)

2.2.10. Espressione dei risultati (2.1.5.7.)

2.3. Metodo per PCR e nested PCR

2.3.1. Principio del metodo

Viene verificata la presenza di DNA specifico per *Cryptosporidium parvum* e *Giardia spp.* estraendo il DNA e amplificando mediante reazione a catena della polimerasi (PCR) con primers specifici. Per *Cryptosporidium parvum* è possibile aumentare la sensibilità del metodo effettuando una ulteriore PCR (Nested PCR) in cui vengono utilizzati primers in grado di appaiarsi all'interno della sequenza amplificata, aumentando in tal modo il segnale ottenuto nel gel di agarosio.

2.3.2. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi, oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio (v. Appendice 1), è necessario disporre di:

- apparecchio per corsa elettroforetica
- bagno maria termostato
- generatore di corrente
- termociclatore
- transilluminatore
- vaschetta per gel

2.3.3. Reagenti

2.3.3.1. Tampone di lisi (100 mL)

Composizione	
NaCl 1 M	12 mL
Tris-HCl 1M	2,5 mL
EDTANa ₂ 100 mM, pH 8	10 mL
SDS 10%	10 mL
Acqua distillata	

Portare la soluzione composta da NaCl, Tris-HCl e EDTANa₂ ad un volume di 90 mL con acqua distillata e autoclavare a 121±3° per 15 minuti. Lasciare raffreddare e aggiungere l'SDS.

2.3.3.2. NaCl 1 M (250 mL)

Composizione	
NaCl	14,61 g
Acqua distillata	

Sciogliere il sale nell'acqua distillata e portare al volume finale di 250 mL.

2.3.3.3. Tris-HCl 1 M (250 mL)

Composizione	
Tris	30,29 mL
Acqua distillata	

Sciogliere il Tris in 200 mL di acqua distillata e portare a pH $7\pm 0,2$ con HCl 0,1N. Portare a volume finale di 250 mL con acqua distillata.

2.3.3.4. EDTANa₂ 100 mM, pH 8 (250 mL)

Composizione	
EDTANa ₂ ·2H ₂ O	9,3 g
Acqua distillata	

Sciogliere l'EDTA in 200 mL di acqua distillata e portare a pH $8\pm 0,2$ con NaOH 0,1 N. Portare a volume finale di 250 mL con acqua distillata.

2.3.3.5. Soluzione SDS 10% (100 mL)

Composizione	
SDS	10 g
Acqua distillata	

Sciogliere l'SDS in 90 mL di acqua distillata e scaldare a $60\pm 1^\circ$ fino a completo scioglimento. Attendere fino a quando la soluzione non torna a temperatura ambiente, poi verificare che il pH sia $7,2\pm 0,2$. Portare a volume finale di 100 mL con acqua distillata.

2.3.3.6. Soluzione stock di proteinasi K

Composizione	
Proteinasi K	
Acqua distillata	

Risospendere l'enzima liofilizzato in un volume noto di acqua distillata a concentrazione di 5000 µg/500 µL e lasciare tutta la notte la soluzione tra $0-8^\circ$.

2.3.3.7. Kit per estrazione del DNA (Qiagen)

Composizione	
Colonne di purificazione del DNA;	
Tampone di preparazione;	
Tampone di lavaggio;	
Tampone di eluizione.	

Conservare a -20° .

2.3.3.8. Kit per PCR

Composizione

Soluzione di MgCl₂;
Tampone di PCR;
Oligonucleotidi (dATP, dCTP,
dTTP, dGTP);
Polimerasi.

Conservare a -20°.

2.3.3.9. Primers per PCR

Primers per *Cryptosporidium*:

CHSP1: 5'-AGCAATCCTCTGCCGTACAGG-3'

CHSP4: 5'-AGAGCATCCTTGATCTTCT-3'

Primers per *Giardia*:

GGL: 5'-AAGTGCCTAACGAGCAGCT-3'

GGR: 5'-TTAGTGCTTTGTGACCATCGA-3'

Risospendere i primers liofilizzati in acqua deionizzata sterile in modo tale da ottenere una soluzione 100 µM. Agitare la soluzione mediante vortex per qualche minuto e tenere a 5±3° tutta la notte. La concentrazione dei primers può essere verificata allo spettrofotometro. La lettura viene eseguita a 260 nm. Conservare a -20°.

2.3.3.10. Primers per Nested-PCR

Primers per *Cryptosporidium parvum*:

CPHSP2511: 5'-ATGACCAAGCTTATTGAAC-3'

CPHSP2769: 5'-GTGATCTTGCTGCTCTTACCA-3'

Risospendere i primers liofilizzati in acqua deionizzata sterile in modo tale da ottenere una soluzione 100 µM. Agitare la soluzione mediante vortex per qualche minuto e tenere a 5±3° tutta la notte. La concentrazione dei primers può essere verificata allo spettrofotometro. La lettura viene eseguita a 260 nm. Conservare a -20°.

2.3.3.11. Soluzione stock di Bromuro di etidio

Composizione

Bromuro di etidio	100 mg
Acqua distillata	10 mL

Sciogliere su agitatore magnetico il bromuro di etidio in polvere in acqua deionizzata sterile. Trasferire la soluzione così ottenuta in provette da 1,5 mL e conservare al buio a 5±3°.

2.3.3.12. Gel di agarosio 2% (100 mL)

Composizione

Agarosio	2 g
TAE 1x	100 mL
Bromuro di etidio	5 µL

Sciogliere l'agarosio nel TAE 1x scaldando leggermente fino a completa dissoluzione della polvere. Aggiungere il bromuro di etidio e mescolare. Versare la soluzione nello stampo per il gel, posizionare lo spaziatore e attendere fino a completa solidificazione. Togliere lo spaziatore e porre il gel nella vaschetta per corsa elettroforetica riempita con TAE 1x (2.3.3.14.). Effettuare la corsa a 70 V per 1 ora. Osservare il gel al transilluminatore.

2.3.3.13. Soluzione TAE 50x (100mL)

Composizione	
Tris	24,2 g
EDTANa ₂ 0,5 M, pH 8	10 mL
Acido acetico glaciale	5,7 mL
Acqua distillata	

Sciogliere il Tris in 60 mL di acqua distillata, aggiungere EDTANa₂ e acido acetico glaciale. Portare a volume finale di 100 mL con acqua distillata, filtrare e sterilizzare a 121±3° per 15 min.

2.3.3.14. Soluzione di TAE 1 x

Composizione	
PBS 50x	20 mL
Acqua distillata	980 mL

Mescolare i due componenti.

2.3.3.15. EDTA Na₂ 0,5 M, pH 8 (400 mL)

Composizione	
EDTANa ₂ 2H ₂ O	74,4 g
Acqua distillata	

Sciogliere l'EDTANa₂ in 300 mL di acqua distillata e portare a pH 8±0,2 con HCl o NaOH 0,1 N. Portare a volume finale di 400 mL con acqua distillata.

2.3.3.16. Tampone di caricamento (Orange G)

Composizione	
Orange G	20 mg
Glicerolo	5 mL
Acqua distillata	10 mL

Mescolare i componenti.

2.3.3.17. Pesi molecolari 100-1000 pb

2.3.4. Procedura per PCR

2.3.4.1. Estrazione del DNA

Centrifugare il campione (50µL derivanti dalla reazione di chiarificazione per immunoseparazione) a 13000 rpm per 20 minuti ed eliminare il supernatante. Risospendere il pellet (non sempre visibile) in 94 µL del tampone di lisi (2.3.3.1.). Effettuare 15 cicli di

congelamento in azoto liquido della durata di 5 minuti e di scongelamento a 65° in bagno maria fino a completo scioglimento del ghiaccio. Aggiungere 6 µL della soluzione di proteinasi K (2.3.3.6.) e incubare tutta la notte a 37±1° in bagno maria, in agitazione. Aggiungere al campione il tampone di preparazione presente nel Kit per estrazione del DNA (2.3.3.7.) e porlo nella colonna di purificazione (2.3.3.7.) precedentemente alloggiata in una provetta da 2 mL. Centrifugare a 10000 x g per 30-60 secondi. Scartare la componente liquida presente nella provetta. Lavare la colonna di purificazione con il tampone di lavaggio fornito nel kit (2.3.3.7.) e centrifugare nuovamente per 30-60 secondi. Scartare la componente liquida e centrifugare nuovamente per 30-60 secondi alla massima velocità. Porre la colonna di purificazione in una nuova provetta da 1,5 mL ed aggiungere 50 µL del tampone di eluizione fornito nel kit (2.3.3.7.). Centrifugare la colonna di purificazione per 1 minuto a 10000 x g e conservare la componente acquosa (circa 50 µL).

2.3.4.2. Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Il DNA estratto viene utilizzato per una PCR con una coppia di primers specifici. Preparare per ogni campione una soluzione (50 µL) 2,5mM di MgCl₂ in PCR buffer 1x, 0,5 µM di ogni primer (2.3.3.9.), 200 µM di dNTP, contenente 2,5 U/100 µL di Taq Polimerasi e 15 µL del DNA estratto; portare la soluzione a volume finale di 50µL con acqua distillata sterile. Eseguire la PCR per *Cryptosporidium* attivando la polimerasi a 95° per 10 min; proseguire con 40 cicli a 95° per 20s, a 60° per 45s e a 72° per 45 s, con un passaggio di estensione a 72° per 5 min. Eseguire la PCR per *Giardia* attivando la polimerasi a 95° per 10 min; proseguire con 40 cicli a 95° per 20s, a 55° per 45s e a 72° per 45s, con un passaggio di estensione a 72° per 5 min. Miscelare i prodotti della PCR (16 µL per campione) con 4 µL del tampone di caricamento (2.3.3.16.). Introdurre la miscela nei pozzetti del gel ed effettuare la corsa su gel di agarosio (2%) (2.3.3.12.).

2.3.4.3. Interpretazione dei risultati

Nella corsa elettroforetica, per considerare il risultato positivo è necessario rilevare la presenza di una banda corrispondente a 590 pb per *Cryptosporidium parvum* e a 163 pb per *Giardia* spp. La presenza di un amplificato atteso non fornisce indicazioni sul numero di cisti ed oocisti presenti ma permette di rilevare la presenza fino a 60 cisti e 120 oocisti.

2.3.5. Procedura per Nested PCR

2.3.5.1. Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Il DNA ottenuto nella precedente PCR viene nuovamente amplificato con una coppia di primers specifici (2.3.3.10.).

Per ogni campione preparare una soluzione (50 µL) 2,5 mM di MgCl₂, in PCR buffer 1x, 0,5 µM di ogni primer (2.3.3.10.), 200 µM di dNTP, contenente 2,5 U/100 µL di Polimerasi e 15 µL del prodotto di PCR; portare la soluzione a volume finale di 50 µL con acqua distillata sterile. Eseguire la PCR per *Cryptosporidium* attivando la polimerasi a 95° per 10 min; proseguire con 40 cicli a 95° per 20 s, a 60° per 45 s e a 72° per 45 s, con uno step di estensione a 72° per 5 min. Miscelare i prodotti della PCR (16 µL per campione) con 4 µL del tampone di caricamento (2.3.3.16.). Introdurre la miscela nei pozzetti del gel ed effettuare la corsa su gel di agarosio (2%) (2.3.3.12.).

2.3.5.2. Interpretazione dei risultati

Nella corsa elettroforetica, per considerare positivo il risultato è necessario rilevare la presenza di una banda a 280 pb per *Cryptosporidium parvum*. La presenza di un amplificato atteso non

fornisce indicazioni sul numero di oocisti presenti ma permette di rilevare la presenza fino a 12 oocisti.

2.5. Metodo per RT-PCR

2.5.1. Principio del metodo

Viene verificata la capacità delle cisti di *Giardia spp.* e delle oocisti di *Cryptosporidium parvum* di produrre un mRNA specifico indice della vitalità delle cisti e delle oocisti. Ciò viene effettuato mediante estrazione aspecifica dell'mRNA e successiva RT-PCR con primers specifici.

2.5.2. Strumentazione e vetreria (2.3.2.)

2.5.3. Reagenti

2.5.3.1. Kit per estrazione dell' mRNA

Composizione	
Sferette paramagnetiche coniugate con oligo(dT) ₂₅	
Tampone di lisi	
Tamponi di lavaggio 1 e 2	

Conservare tra 2-8 °.

2.5.3.2. Soluzione di DEPC -Acqua

Composizione	
DEPC	0,1 g
Acqua distillata	100 mL

Porre il contenitore da utilizzare per preparare la soluzione a 180° in stufa per almeno 4 ore, con l'ancoretta magnetica e l'apposito tappo.

Mettere l'acqua distillata ed il DEPC nel contenitore; mantenere la soluzione in agitazione per tutta la notte mediante agitatore magnetico. Sterilizzare la soluzione in autoclave a 121±3° per 20 minuti.

Utilizzare la soluzione a temperatura ambiente.

2.5.3.3. Kit per RT-PCR

Composizione	
Soluzione di MgCl ₂	
Tampone di PCR	
Oligo(dT) ₁₆	
Oligonucleotidi (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	
Inibitori delle RNase	
Reverse Transcriptasi	
Polimerasi	

Conservare a -20°.

2.5.3.4. Matrice Ultrapura (Bio-Rad)

Prima dell'uso porre la matrice su agitatore magnetico a velocità moderata per mantenerla in sospensione.

2.5.4. Procedura

2.5.4.1. Estrazione dell'mRNA

Centrifugare la provetta da 1,5 mL contenente le cisti e le oocisti vitali (50 µL della soluzione derivante dalla reazione di chiarificazione per IMS) a 5000 x g per 5 minuti. Eliminare il supernatante. Aggiungere al pellet ottenuto dalla centrifugazione 200 µL di una matrice ultrapura (2.5.3.4.)

Incubare la provetta a 45±1° per 45 minuti. Nelle fasi successive è necessario lavorare in ghiaccio. Aggiungere successivamente 200 µL del tampone di lisi contenuto nel kit di estrazione dell'mRNA (2.5.3.1.).

Sottoporre la soluzione a 5 cicli di congelamento in azoto liquido e scongelamento in un bagno maria a 37±1°.

Dopo aver centrifugato la provetta a 12000 x g per 5 min alla temperatura di 4±1°, prelevare il supernatante contenente l'mRNA e porlo in una provetta da 1,5 mL.

Agitare manualmente i flaconcini contenenti le sfere paramagnetiche coniugate con Oligo(dT)₂₅ (2.5.3.1.). Prelevare 20 µL di sfere per ogni campione e porli in una provetta da 1,5 mL. Alloggiare la provetta nel dispositivo magnetico (2.1.2.) ed eliminare il supernatante; effettuare un lavaggio con il tampone di lisi contenuto nel kit di estrazione dell'mRNA (2.5.3.1.).

Risospingere le sfere in 20 µL di tampone di lisi (2.5.3.1.) e aggiungerle al campione. Agitare manualmente per qualche minuto.

Alloggiare la provetta nel dispositivo magnetico e agitare manualmente per 3-5 minuti compiendo un movimento di circa 90° ogni secondo. Eliminare il supernatante.

Effettuare un lavaggio con 300 µL del tampone di lavaggio 1 e due lavaggi con tampone di lavaggio 2 entrambi contenuti nel kit di estrazione dell'mRNA (2.5.3.1.).

L'mRNA legato alle sfere può essere direttamente aggiunto alla miscela per la reazione di RT-PCR (2.5.4.2.).

2.5.4.2. Reazione di RT-PCR

L'mRNA legato alle sfere viene utilizzato per una reazione di trascrizione inversa in vitro Utilizzando i reattivi contenuti nel kit per RT-PCR (2.5.3.3.) preparare per ogni campione una soluzione (25 µL) 5 mM di MgCl₂ in PCR buffer 1x, 1 mM di ogni nucleotide, 1,7 µM di oligo (dT)₁₆, contenente 20U\100 µL di inibitori delle Rnase, 50U\100 µL di Reverse Transcriptasi e 5 µL del mRNA estratto; portare la soluzione a volume finale di 25 µL con DEPC-H₂O (2.5.3.2.).

Scaldare il campione a 42°±1 per 30 minuti, poi a 95° per 5 min e conservare a 5±3°.

Il cDNA ottenuto dalla reazione di RT-PCR viene utilizzato per una PCR con una coppia di primers specifici (2.3.3.9.).

Preparare per ogni campione una soluzione (50 µL) 2,5 mM di MgCl₂ in PCR buffer 1x, 0,5 µM di ogni primer (2.3.3.9.), contenente 1,5 U\100µL di Polimerasi e 10 µL del cDNA; portare al volume finale di 50 µL con acqua distillata sterile.

Eeguire la PCR per *Cryptosporidium* attivando la polimerasi a 95° per 10 min; proseguire con 40 cicli a 95° per 20 s, a 60° per 45 s e a 72° per 45 s, con uno step di estensione a 72° per 5 min.

Eeguire la PCR per *Giardia* attivando la polimerasi a 95° per 10 min; proseguire con 40 cicli a 95° per 20 s, a 55° per 45 s e a 72° per 45 s, con uno step di estensione a 72° per 5 min.

Miscelare i prodotti della PCR (16 µL per campione) con 4 µL del tampone di caricamento (2.3.3.16.). Introdurre la miscela nei pozzetti del gel ed effettuare la corsa su gel di agarosio (2%) (2.3.3.12.).

2.5.4.3. Interpretazione dei risultati

Nella corsa elettroforetica per considerare positivo il risultato è necessario rilevare la presenza di una banda corrispondente a 590 pb per *Cryosporidium parvum* e a 163 pb per *Giardia spp.* La presenza di un amplificato atteso non fornisce indicazioni sul numero di cisti ed oocisti presenti, ma permette di rilevare la presenza fino a 10 cisti e 10 oocisti.