

# DETERMINAZIONE DI *AEROMONAS* SPP.

## 0. Generalità e definizioni

I microrganismi appartenenti al genere *Aeromonas*, famiglia *Aeromonadaceae*, sono bastoncelli motili e non motili, non sporigeni, gram-negativi, ossidasi positivi, facoltativi anaerobi. Hanno molte caratteristiche biochimiche in comune con quelli della famiglia delle *Enterobacteriaceae*, differenziandosi primariamente per la positività alla citocromossidasi; alcune specie sono glucuronidasi positive.. La tassonomia del genere è in continua evoluzione per quanto riguarda il rilievo delle caratteristiche fenotipiche e delle proprietà genetiche. Finora è stata accertata l'esistenza di 18 gruppi di ibridizzazione non tutti distinguibili su base biochimica. La classificazione tradizionale riporta la distinzione tra *Aeromonas salmonicida*, specie psicofila non motile e patogeno dei pesci, e *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*, *A. veronii* e *A. schubertii*, specie mesofile.

Alcuni genotipi sono considerati potenziali responsabili di patologie (infezioni sistemiche, gastroenteriche e cutanee) per l'uomo e negli anni '80 l'Organizzazione Mondiale della Sanità aveva inserito *Aeromonas* nell'elenco degli agenti enteropatogeni emergenti. I dati più recenti, tuttavia, non confermano né smentiscono le potenzialità degli *Aeromonas* come enteropatogeni. Infatti, dosi infettanti variabili tra  $10^7$  e  $10^{10}$  hanno dato luogo, in maniera incongrua, a gastroenteriti nell'uomo e le stesse frequenze di isolamento di *Aeromonas* spp. sono state osservate in adulti sintomatici e asintomatici. Inoltre, negli anni più recenti, è stato messo in evidenza, tramite l'uso di tecniche molecolari, che spesso i genotipi che si ritrovano nell'ambiente, non hanno le stesse caratteristiche di quelli patogeni.

Sebbene la patogenesi delle infezioni da *Aeromonas* rimanga tuttora incerta, le specie mesofile possiedono numerosi fattori di virulenza che comprendono meccanismi di adesione e produzione di numerose tossine. L'espressione di fattori di virulenza, in alcuni casi, sembra influenzata dalle condizioni ambientali e stagionali.

Il microrganismo è ubiquitario ed autoctono in tutti gli ambienti acquatici. La sua presenza viene associata allo sviluppo di fenomeni di produzione di biofilm dove viene rilevato con una relativa frequenza. Nelle acque in rete, l'aumento delle sue densità generalmente è messo in relazione ad una diminuzione della concentrazione di cloro residuo libero, sebbene le sue più alte densità in acque clorate siano rilevate soprattutto nel periodo estivo. *Aeromonas hydrophila* viene rilevato in acque con pH tra 5,2 e 9,8 e con temperature variabili da 4°C a 45°C, con una più alta frequenza tra 20°C e 35°C. Generalmente, le concentrazioni di *Aeromonas* nelle acque sembrano seguire un andamento stagionale: analisi di regressione multipla sembrano indicare che la sua crescita in acque clorate sia in rapporto alla temperatura dell'acqua – al di sopra di 14,5° - e alla concentrazione di cloro – al di sotto di 0,3 mg/L. La sua presenza viene rilevata anche in assenza di *Escherichia coli* e difficile risulta stabilire un rapporto tra le sue densità e quelle degli indicatori di contaminazione fecale e degli eterotrofi cresciuti a 22° e 37°, soprattutto in acque poco inquinate e in acque potabili trattate e non trattate.

Riferimenti a valori limite per le concentrazioni del microrganismo nelle acque potabili sono quelli proposti dalle autorità sanitarie olandesi che raccomandano valori intorno a 200 UFC/100 mL (Unità Formanti Colonia) nelle acque durante la distribuzione e intorno a 20 UFC/100 mL nelle acque all'impianto di trattamento. Tuttavia, poiché il numero di *Aeromonas* spp. nelle acque in distribuzione è generalmente basso se comparato a quello rilevato negli alimenti ( $10^3$ - $10^5$ UFC/g), l'esposizione (per contatto, ingestione) ad acque trattate in cui è presente *Aeromonas* probabilmente costituisce un rischio molto basso.

La ricerca dei microrganismi appartenenti a questo genere non è prevista dalla normativa italiana riguardante la determinazione della qualità delle acque destinate al consumo umano. Tuttavia, a causa del gran numero di segnalazioni relative alla presenza di *Aeromonas* nelle reti acquedottistiche, si ritiene opportuno fornire il metodo di analisi che ne permette la determinazione quantitativa.

## 1. Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per il rilevamento di *Aeromonas* nelle acque sorgive, sotterranee e superficiali, destinate o da destinare al consumo umano.

## 2. Principio del metodo

Metodo della filtrazione su membrana. Il metodo consente di determinare, in campioni di acqua, la concentrazione di batteri appartenenti al genere *Aeromonas* che hanno formato colonie su una membrana posta su un terreno colturale agarizzato. Dopo incubazione alla temperatura di  $28 \pm 1^\circ$  per  $24 \pm 2$  ore, contare le colonie tipiche (*Aeromonas* presuntivo) e sottoporle a conferma

## 3. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (Appendice 1).

## 4. Terreni di coltura e Reagenti

### 4.1. Substrato di isolamento

#### 4.1.1. Terreno Selettivo di base m-*Aeromonas* Agar

Composizione		
Triptosio	5	g
Estratto di lievito	2	g
Destrina	11,4	g
Cloruro di sodio	3	g
Cloruro di potassio	2	g
Solfato di magnesio	0,1	g
Cloruro ferrico	0,06	g
Sodio desossicolato	0,1	g
Blu di bromotimolo	0,08	g
Agar	13	g
Acqua distillata	1000	mL
pH $8 \pm 0,2$		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata e riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Sterilizzare in autoclave a  $121 \pm 3^\circ$  per 15 min. Raffreddare a  $50 \pm 5^\circ$  ed aggiungere sterilmente una soluzione di Ampicillina (4.1.2.).

#### 4.1.2. Soluzione di Ampicillina

Composizione		
Ampicillina	5	g
Acqua distillata	5	mL

L'antibiotico è anche disponibile in commercio in forma disidratata; reidratare, rispettando le comuni regole di asepsi, aggiungendo 5 mL di acqua distillata sterile. In alternativa sciogliere l'ampicillina in

acqua distillata e sterilizzare per filtrazione. Aggiungere al substrato di isolamento (4.1.1.) già sterilizzato in ragione di 1 mL/100 mL di terreno.

Il prodotto è classificato come Xn - Nocivo. Può causare sensibilizzazione per contatto e inalazione. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione e lo smaltimento: protezione respiratoria (mascherina antipolvere, o uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).

#### 4.1.3. Terreno Selettivo completo m-Aeromonas Agar

Composizione		
Terreno Selettivo di base m-Aeromonas Agar (4.1.1.)	100	mL
Soluzione di ampicillina (4.1.2.)	1	mL

Al substrato di isolamento (4.1.1.) già sterilizzato aggiungere, rispettando le comuni regole di asepsi, la soluzione di ampicillina (4.1.2.) in ragione di 1 mL/100 mL di terreno. Mescolare e distribuire in capsule di Petri.

Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, a  $5\pm 3^\circ$  per non più di una settimana in condizioni ottimali.

Per controlli di qualità utilizzare come controllo positivo *Aeromonas hydrophila* ATCC 7965 e come controllo negativo *E. coli* ATCC 25922.

## 4.2. Substrato di crescita

### 4.2.1. Triptone Soia Agar

Composizione		
Triptone	15	g
Peptone di soia	5	g
Sodio cloruro	5	g
Agar	20	g
Acqua distillata	1000	mL
pH $7,2\pm 0,2$		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a  $121\pm 3^\circ$  per 15 min. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare.

Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, a  $5\pm 3^\circ$  per non più di una settimana in condizioni ottimali.

## 4.3. Reagenti

### 4.3.1. Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

Composizione		
N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato	1	g
Acqua distillata	100	mL

Dischetti o tamponi adatti all'uso sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al

momento dell'uso. È da segnalare che tale prodotto viene classificato, ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti, come sostanza pericolosa.

## 5. Procedura

### 5.1 Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 100 mL, è comunque in funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare.

### 5.2. Filtrazione ed incubazione

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro (porosità nominale di 0,45 µm). Porre la membrana sulla superficie del terreno di isolamento (4.1.3.) e procedere all'incubazione a  $28\pm 1^\circ$  per  $24\pm 2$  ore.

### 5.3. Identificazione e conteggio delle colonie

Sul substrato di isolamento (4.1.3.) i microrganismi appartenenti al genere *Aeromonas* sviluppano, con viraggio del terreno, colonie di colore giallo, caratteristica dovuta alla fermentazione della destrina, ben distinguibili da colonie di altri microrganismi che possono crescere sullo stesso terreno. In alcuni casi sono infatti state individuate colonie bianche (*Alcaligenes* sp.), rosse (*Serratia* sp.) e verdi (*Pseudomonas* sp.). Contare tutte le colonie gialle tipiche come *Aeromonas* presuntivo.

## 6. Conferma

Per la verifica dell'appartenenza al genere *Aeromonas* è necessario procedere almeno allo svolgimento della prova della citocromossidasi. E' possibile altrimenti effettuare direttamente l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica disponibili in commercio.

Prima di effettuare la prova di conferma è necessario, onde verificarne la purezza, subcoltivare, preferibilmente, tutte o comunque un numero rappresentativo di colonie sospette su Triptone Soia agar (4.2.1.) (4.2.7.) incubando a  $28\pm 1^\circ$  per  $24\pm 2$  ore. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

### 6.1. Prova della citocromossidasi

La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti al genere *Aeromonas* in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi.

Dal terreno Triptone Soia Agar (4.2.1.) prelevare, con le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia sospetta e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (4.3.1.) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uso distribuiti in commercio. Una reazione positiva si evidenzia quando una colorazione blu-violetto si sviluppa entro pochi secondi.

*Aeromonas* è ossidasi-positivo.

## 7. Espressione dei risultati

La concentrazione di *Aeromonas* spp. si calcola in base al numero di colonie contate e sottoposte a conferma, considerando l'eventuale diluizione e riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL). Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla

membrana e tenendo conto dei risultati della prova di conferma, calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla formula:

$$C = \frac{A \times N \times V_s \times F}{B \times V_t}$$

dove

<i>C</i>	numero di colonie che sono state confermate per 100 mL
<i>A</i>	numero di colonie confermate
<i>B</i>	numero di colonie sottoposte a conferma
<i>N</i>	numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana
<i>V<sub>t</sub></i>	volume di campione analizzato (in mL)
<i>V<sub>s</sub></i>	volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL)
<i>F</i>	fattore di diluizione

## BIBLIOGRAFIA

- Havelaar A.H., M. During, J.F.M. Versteegh. Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. *Journal of Applied Bacteriology* 1987, 62: 279-287.
- Sartory D., L. Bonadonna, J.M. Delattre, P.Gosling, M. Janda, and D. van der Kooij. *Aeromonas*. In: Guidelines for drinking-water quality. Addendum Microbiological agents in drinking water, pp.1-17. World Health Organization, 2002.
- Semproni M. e L. Bonadonna. Metodo per la ricerca e l'isolamento di *Aeromonas* sp. in acque destinate al consumo umano. *Notiziario dei metodi analitici, IRSA, Consiglio Nazionale delle Ricerche*, 1997: 11-15.