

DETERMINAZIONE DEGLI ENTEROCOCCHI

0. Generalità e definizioni

Sebbene Bartram e Rees considerino i termini streptococchi fecali, enterococchi, enterococchi intestinali e gruppo *Enterococcus* sinonimi nel caso delle specie rilevabili nell'ambiente, l'ordinamento tassonomico del gruppo di microrganismi che venivano compresi sotto l'unica definizione di streptococchi fecali, negli ultimi anni, è stato soggetto ad ampia revisione. Gli studi più recenti hanno distinto, infatti, sulla base di caratteristiche fisiologiche e di tecniche di ibridizzazione del DNA, tre generi diversi di cui due - *Enterococcus* e *Streptococcus* - comprenderebbero specie intestinali o di sicura origine fecale.

Gli enterococchi sono cocchi gram positivi, catalasi negativi, si presentano isolati, doppi o più frequentemente a catena e sono provvisti dell'antigene D. Il genere comprende 17 specie determinate sulla base delle sequenze della subunità 16S dell'rRNA che hanno permesso di individuare la presenza di specie di gruppo. Le specie appartenenti al genere *Enterococcus*, che vengono definite in grado di ridurre il 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro a formazano e di idrolizzare l'esculina a 44 °C, soddisfano specifici requisiti: crescita a 10 °C e 45 °C, resistenza a 60 °C per 30 minuti, crescita a pH 9,6 e al 6,5% di NaCl, idrolisi del 4-metilumbelliferil- β -D-glucoside in presenza di tallio acetato, acido nalidixico e 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro. Gruppi diversi sono stati individuati in questo genere e comprendono le specie *Ent. faecium*, *Ent. durans*, *Ent. hirae*, *Ent. mundtii* (primo gruppo); *Ent. avium*, *Ent. pseudoavium*, *Ent. raffinosus* e *Ent. malodoratus* (secondo gruppo); *Ent. casseliflavus* e *Ent. gallinarum* (terzo gruppo). *Ent. faecalis*, *Ent. cecorum*, *Ent. colombae* e *Ent. saccharolyticus*, che hanno tra loro una bassa similarità genotipica, sono stati inseriti in un quarto gruppo. L'appartenenza al genere *Enterococcus* di specie diverse anche dal punto di vista molecolare comporta difficoltà nell'individuare test fenotipici capaci di identificare il genere. Anche il test già comunemente utilizzato per una conferma dell'appartenenza al gruppo, l'idrolisi dell'esculina, se ancora utile ad individuare anche le nuove specie del genere *Enterococcus*, fornisce comunque reazione positiva anche per microrganismi appartenenti ai generi *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* e *Leuconostoc*. Secondo la nuova tassonomia, nel genere *Streptococcus* si individuano gli streptococchi orali, gran parte dei quali opportunisti patogeni e poco adattabili alla sopravvivenza nell'intestino e gli streptococchi di prevalente derivazione animale con habitat intestinale (streptococchi intestinali). Le specie che vengono comprese in quest'ultimo sottogruppo (*Strep. bovis*, *Strep. equinus*, *Strep. alactolyticus*, *Strep. suis*, *Strep. intestinalis*, *Strep. hyointestinalis*) hanno caratteristiche diverse dal punto di vista genotipico e differente significato sanitario. La loro proporzione è diversa nelle feci delle diverse specie animali e comunque sempre prevalente rispetto alla loro concentrazione nelle feci umane. Tuttavia, se queste differenze avevano precedentemente consentito di avanzare l'ipotesi di ottenere indicazioni sulla origine fecale dell'inquinamento, anche sulla base del rapporto tra i due indicatori, coliformi e streptococchi, è stato verificato che la valutazione del rapporto tra gli indicatori, per stabilire l'origine della contaminazione, può portare a conclusioni ed interpretazioni errate. Infatti, è stato calcolato che, a causa della diversa capacità di sopravvivenza nelle acque da parte dei microrganismi considerati e della maggiore resistenza all'azione dei disinfettanti da parte del gruppo degli enterococchi/streptococchi, la proporzione numerica tra i due gruppi di indicatori è comunque alterata.

La presenza di enterococchi nelle acque destinate al consumo umano è segnalata raramente. Evenienze di questo tipo sono comunque da mettere in relazione a sicura contaminazione di origine fecale, spesso dovuta ad infiltrazioni dall'esterno o a fenomeni di cross-connection. Inoltre, gli enterococchi nelle acque in distribuzione sono un segnale della ridotta efficienza del sistema di trattamento delle acque.



Negli ultimi anni sono stati formulati metodi rapidi per la ricerca dei microrganismi appartenenti al genere *Enterococcus* basati su attività enzimatiche specifiche e che non necessitano dello svolgimento di prove di conferma. I metodi più classici sono comunque da ritenersi ancora validi anche se tuttora comportano lo svolgimento di prove aggiuntive per l'accertamento dell'appartenenza al genere.

Nelle acque destinate al consumo umano è prescritta l'assenza obbligatoria degli enterococchi in relazione al loro ruolo di indicatore primario di contaminazione fecale. Il superamento del valore parametrico (Enterococchi 0 in 100 o 250 mL) costituisce una non conformità al valore stabilito dal Decreto Legislativo n. 31 del 2001.

1. Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per la determinazione degli enterococchi 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 *Enterococcus* che hanno formato colonie su una membrana posta su un terreno colturale agarizzato. Dopo incubazione alla temperatura di $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per 40-48 ore, contare le colonie tipiche (enterococchi presuntivi) e sottoporle a conferma tramite la verifica dell'idrolisi dell'esculina.

Il metodo fa riferimento alla norma ISO 7899-2:2000.

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 di base di Slanetz e Bartley

Composizione		
Triptosio	20	g
Estratto di lievito	5	g
Destrosio	2	g
Dipotassio idrogeno fosfato	4	g
Sodio azide	0,4	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL

Il terreno di base si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. A 1 L di terreno, aggiungere sterilmente 10 mL di soluzione di 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC) (4.1.2.), miscelando con cura. Non sterilizzare. In alcune formulazioni il terreno ha già tra i suoi componenti il TTC.

Il terreno è classificato come Xn - Nocivo. È pericoloso per inalazione. La scheda di sicurezza, a cui è necessario fare riferimento, informa che l'azide sodica, presente nel terreno, può avere effetti

irritanti per gli occhi e per la pelle. Durante la manipolazione e lo smaltimento è necessario adottare particolari precauzioni: protezione respiratoria (mascherina antipolvere, o uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).

4.1.2. Soluzione di trifeniltetrazolio cloruro

Composizione		
2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro	1	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere il trifeniltetrazolio cloruro nell'acqua distillata. Sterilizzare per filtrazione (porosità nominale di 0,2 μ m). Proteggere la soluzione dalla luce ed eliminare nel caso in cui si sviluppi una colorazione rosa.

4.1.3. Terreno completo di Slanetz e Bartley

Composizione		
Terreno di base (4.1.1.)	1000	mL
2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (4.1.2.)	10	mL
pH 7,2 $\pm$ 0,2		

Aggiungere 10 mL di soluzione di 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro ad 1 L di terreno di base mantenuto a (50 $\pm$ 5) °C. Nel caso sia necessario correggere il pH, utilizzare una soluzione di sodio carbonato (100 g/L) o di sodio idrossido (40 g/L) o di acido cloridrico (36,5 g/L).

Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a (5 $\pm$ 3) °C al riparo dalla luce per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

Per controlli di qualità è consigliabile utilizzare come controllo positivo *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e come controllo negativo *E. coli* ATCC 25922; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

4.2. Terreno per la prova di conferma

4.2.1. Terreno all'Esculina-bile-azide Agar

Composizione		
Tryptone	17	g
Peptone	3	g
Estratto di lievito	5	g
Bile di bue	10	g
Esculina	1	g
Ferro (III) ammonio citrato	0,5	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio azide	0,15	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,1 $\pm$ 0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare in autoclave a (121 $\pm$ 3) °C per 15 min. Distribuire in capsule di Petri e lasciare solidificare. Conservare a (5 $\pm$ 3) °C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.



5. Procedura

5.1. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 100 mL per le acque in distribuzione e a 250 mL per le acque imbottigliate, è comunque 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, con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori nominale di 0,45 µm (pori simmetrici da 0,45 µm oppure pori asimmetrici 0,7/0,2 µm). Porre la membrana sulla superficie del terreno di Slanetz e Bartley (4.1.3.) e procedere all'incubazione a $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ per $(40 \div 48)$ ore.

5.3. Identificazione e conteggio delle colonie

Sono considerate come tipiche le colonie di colore dal rosa al rosso scuro e marrone (al centro o su tutta la colonia).

6. Conferma

6.1. Prova dell'idrolisi dell'esculina

In presenza di colonie tipiche, trasferire la membrana sul terreno all'Esculina bile azide agar (4.2.1.) pre-riscaldato a 44°C . Incubare a $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$ per 2 ore. Dopo incubazione si considerano positive le colonie in corrispondenza delle quali, sul retro della membrana, sul terreno all'esculina compare un alone nero-marrone. È possibile prolungare l'incubazione oltre le 2 ore.

7. Espressione dei risultati

La concentrazione di enterococchi 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). Qualora si tratti di acque imbottigliate considerare come volume di riferimento 250 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

C	numero di colonie che sono state confermate per 100 mL
A	numero di colonie confermate
B	numero di colonie sottoposte a conferma
N	numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana
V_t	volume di campione analizzato (in mL)
V_s	volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL)
F	fattore di diluizione



Bibliografia

1. Bartram J. and Rees G. (Ed.). Monitoring bathing waters, 2000. E & FN Spon, London and New York.
2. Leclerc H., Devriese L.A. and Mossel D.A.A. (1996). Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. J Appl Bacteriol 1996, 81: 459-466.
3. Metodi Analitici per le Acque. Volume terzo. APAT/IRSA-CNR, 29/2003.
4. UNI EN ISO 7899-2:2003: Qualità dell'acqua - Ricerca ed enumerazione degli enterococchi intestinali – Parte 2. Metodo di filtrazione su membrana.