PAGINE APERTE

VALUTAZIONE QUANTITATIVA DI SALMONELLA IN FANGHI DI RISULTA

Faccio seguito all'appello lanciato nell'articolo comparso nel n. 1/94 di Biologia Ambientale per discutere sulle difficoltà insite in analisi di tipo quantitativo da eseguire su particolari matrici ambientali per ricercare parametri che, come *Salmonella*, sono stati per lo più rilavati con il sistema generico della presenza/assenza.

La ricerca con i metodi colturali classici di organismi appartenenti alla categoria del rischio reale –organismi cioè realmente patogeni qualora, nella dose giusta, siano assunti da idonei soggetti riceventi– costituisce un problema quando questi germi vanno ricercati in matrici che contengono una eccessiva componente microbiologica concorrente. È il caso dei fanghi di impianti di depurazione, del suolo e dei sedimenti di corpi idrici, dove la carica batterica totale aerobica è rappresentata da milioni-miliardi di unità/g. La mancanza di terreni effettivamente selettivi, che consentano cioè la crescita ai soli batteri bersaglio, comporta indubbi problemi per la ricerca quantitativa. Rientrano in questo caso tutti i substrati di arricchimento-rivitalizzazione disponibili per la ricerca di *Salmonella*, che non sono in grado di inibire lo sviluppo di microrganismi competitori. La diversa condizione fisiologica in cui si trovano i batteri di interesse (di solito con un metabolismo rallentato) rispetto a quelli più tipicamente ambientali svantaggia la replicazione dei primi mentre favorisce quella dei secondi.

Se si tengono in conto queste premesse è evidente che al crescere della quantità (volumetrica o ponderale) degli inoculi non necessariamente si avrà una maggiore probabilità di rinvenire *Salmonella*, anzi, spesso si verificherà il contrario.

L'applicazione di un sistema MPN con esame multiplo di dosi crescenti (ad esempio: 0,1 - 1 - 10 g o mL) darà più frequentemente risultati positivi con gli inoculi più bassi (0,1 g o mL) ed esiti quasi costantemente negativi nei tubi insemenzati con gli inoculi più elevati.

Molti operatori hanno avuto la percezione di questa condizione nel corso dell'applicazione della procedura MPN a campioni peculiari, ricchi di flora batterica più tipicamente ambientale, come nel caso, ad esempio, dell'analisi di omogenati di molluschi eduli

lamellibranchi. Per ovviare alla "stranezza" dei risultati che mostrano –contro ogni principio di distribuzione statistica– negatività agli inoculi maggiori (10 e 1 mL) e positività nei tubi insemenzati con solo 0,1 mL, si usa ritenere positivi anche i primi e si giustifica l'esito con la concorrenza biologica esercitata dai germi più tipicamente ambientali nei confronti di quelli orientativamente fecali. Ciò è tanto più vero quanto più le temperature applicate nel corso della incubazione non sono o non possono essere selettive. A 37 °C crescono infatti anche i mesofili ambientali che costituiscono, nei nostri climi, la microflora prevalente.

Quanto sopra detto "calza a pennello" anche alla valutazione quantitativa di *Salmonella* nei fanghi di impianti di depurazione.

Il primo inoculo che si fa a partire da un campione di tal fatta viene eseguito in acqua peptonata 0,1%, se si tratta di una semplice rivitalizzazione, altrimenti si impiega un substrato specifico se si tratta già di una selezione (o, meglio, di una "elezione", come nel caso di *Salmonella*). Si ricorre a questa pratica ogni qualvolta il patogeno è ritenuto presente in bassi titoli a fronte di una ricca flora concorrente, ricordando che l'impiego immediato di terreni selettivi solidi per l'isolamento delle colonie è sempre da sconsigliare perché essi sono, in un certo senso, tossici anche per l'organismo da ricercare.

Limitatamente al genere *Salmonella*, un aumento della selettività può essere ottenuto nella fase di arricchimento/rivitalizzazione innalzando la temperatura di incubazione a 41,5 °C nel prearricchimento (temperatura che sfavorisce i mesofili ambientali), ma questa pratica può essere lesiva della vitalità di alcuni sierotipi di *Salmonella*, tra cui *Salmonella typhi*. Inoltre la temperatura aumenta la capacità inibente di un terreno nei confronti di *Salmonella* "injured" soprattutto ai bassi inoculi.

Ferma restando, quindi, la idoneità dei terreni e delle temperature delle successive fasi della metodica di rilevamento indicati nell'articolo cui faccio riferimento, suggerisco di seminare al massimo 0,1 e 1 g di campione (peso umido) nel caso di fango disidratato e 0,1 e 1 mL di fango pompabile, enfatizzando che la ricerca ha dimostrato come, nel caso dell'analisi dei sottoprodotti della depurazione dei liquami, si abbia maggior successo nel ritrovamento di *Salmonella* con l'inoculo di una sola goccia di fango piuttosto che con quella di quantità maggiori.

Ho sempre guardato con sospetto esiti negativi relativi alla ricerca di *Salmonella* in fanghi di risulta, specie se originati dai reflui di un grande centro abitato. Infatti, più grande è un agglomerato sociale maggiore è il numero di organismi che, come *Salmonella*, sono normalmente circolanti e sempre presenti nei liquami.

La scelta del saggio su aliquote contenute tiene anche conto della esperienza e delle linee guida fornite da agenzie internazionali sul controllo delle acque di scarico. Nei saggi quantitativi sui liquami si consiglia, infatti, di saggiare aliquote di 10, 1 e 0,1 mL, ed eccezionalmente (in caso di reflui di debole "forza") di 100, 10 e 1 mL.

I piccoli volumi esaminati possono far sorgere dubbi sulla rappresentatività dei subcampioni analizzati rispetto al campione di origine. Si può ovviare a ciò omogeneizzando o quartando bene il materiale e quindi moltiplicando le osservazioni, replicando cioè 10 o più volte l'analisi riferita a ciascun quantitativo (0,1 e 1 g o mL/provetta). La onerosità delle repliche è solo un fatto manuale poiché, eliminando i grandi inoculi, si risparmia sui costi di analisi relativi alla produzione di cospicui volumi di terreno di prearricchimento.

Per quanto attiene il primo ripasso (passaggio dalla fase di prearricchimento a quella successiva di arricchimento) non esistono indicazioni certe. Se *Salmonella* ha una fase di latenza lunga, ma un tempo di replicazione più corto di quello degli altri batteri mesofili ambientali, il miglior secondo prearricchimento si ottiene con il più piccolo inoculo possibile. Al contrario, se *Salmonella* ha una fase di lag più corta, ma più lunghi tempi di duplicazione occorre trapiantare nel secondo arricchimento un volume più consistente (1/4 o 1/8 del volume totale). Questa regola tiene conto della esponenzialità della moltiplicazione batterica una volta che essa si sia innescata; ogni centro di ricerca dovrebbe basarsi sulla propria esperienza, che è anche dipendente dagli stipiti batterici di interesse per ciascuna specifica area.

La prosecuzione della analisi procede come sempre. Il computo della presenza di *Salmonella* per g o mL di materiale esaminato (peso umido) nel caso di serie non standardizzate di inoculi si fa applicando la

formula di Thomas:

$$\textit{Salmonella}\ (\text{MPN}) = \frac{\text{n° tubi positivi}}{\sqrt{\left(\begin{matrix}\text{mL o g di}\\ \text{camp. nei}\\ \text{tubi neg.}\end{matrix}\right) \cdot \left(\begin{matrix}\text{mL o g di}\\ \text{camp. nei}\\ \text{tubi pos.}\end{matrix}\right)}}$$

Per passare al peso secco si dovrà correggere il risultato sopra espresso in peso umido, procedendo alla disidratazione di idonee aliquote in stufa a 180 °C, fino al raggiungimento del peso costante.

Allo stato attuale delle conoscenze, l'indagine quantitativa per la ricerca di *Salmonella* non può essere che colturale: in futuro le tecniche di biologia molecolare risolveranno le difficoltà legate alla competizione che si scatena sui terreni liquidi e alla lunghezza dei tempi di analisi, ricercando *Salmonella* direttamente nel campione.

In verità, già oggi sono disponibili commercialmente immunosaggi che, però, hanno l'inconveniente della limitata sensibilità.

Una tecnica usa anticorpi polivalenti I o fluorescenti in grado di rilevare il 95% dei sierotipi di *Salmonella* responsabili delle infezioni umane, con una soglia di sensibilità che è di $7{,}5 \times 10^3$ batteri/mL o g. Questo limite potrebbe rendere la metodica di interesse per il controllo dei fanghi, previa concentrazione. Tuttavia, controlli eseguiti su un numero limitato di campioni in parallelo con questa tecnica e con la più tradizionale metodica dell'MPM, hanno messo in rilievo una inaffidabilità della tecnica, che era in grado di rilevare la presenza di *Salmonella* solo nel 50% dei campioni di acqua di fogna o nel 25% di quelli di acque clorate (Desmonts et al., 1990).

Un sistema ELISA che usa anticorpi fluorescenti in micropozzetti è stato sviluppato e applicato alla ricerca di salmonelle nel suolo, ma anche qui il limite di rilevamento è ancora troppo alto (10^6 cellule/g di suolo (Turpin et al., 1993).

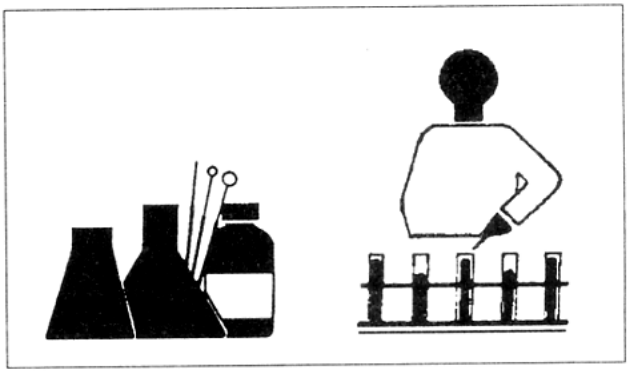
Sonde DNA polinucleotidiche sono state prodotte da tempo per il rilevamento di *Salmonella* negli alimenti (Fitts et al., 1983) e in ambienti estuariali (Knight et al., 1990). Tali tecnologie, abbinate a metodi di estrazione del DNA dalle matrici da saggiare, consentiranno in futuro un controllo quantitativo rapido e realistico.

Laura Volterra, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Bibliografia

Desmonts C., Minet J., Colwell R., Cornier M. - 1990.
Fluorescent antibody method useful for detecting viable but nonculturable *Salmonella* spp. in wastewater.
App. Environ. Microbiol., **56** (5): 1443-1552.

Fitts R., Diamond M., Hamilton C., Neri M. - 1983
DNA-DNA hybridization assay for detection of *Salmonella* spp. in foods.
Appl. Environ. Microbiol., **46**: 1146-1153.

Knight I.T., Shults S., Kaspar C.W., Colwell R.R. -1990.
Direct detection of *Salmonella* spp. in estuaries by using a DNA probe.
Appl. Environ. Microbiol., **56**: 1059-1064.

Turpin P.E., Maycroft K.A., Rowlands C.L., Wellington E.M.H. - 1993.
Viable but not culturable salmonellas in soil.
J. Appl. Bacteriol., **74**: 421-427.