

2017

PREMESSA

Il rilevamento della contaminazione microbica nelle matrici ambientali e più in generale in luoghi e ambienti di lavoro e di vita, è importante per la salvaguardia dello stato di igiene e di salute della popolazione. Esistono numerose tecniche per rilevare i microrganismi patogeni come la *Legionella*, nelle matrici ambientali.

In quest'ambito la metodica maggiormente utilizzata è quella colturale, dopo un campionamento di acqua in bottiglie o di aria in gorgogliatori e/o piastre. Tali metodi pur permettendo l'isolamento e la quantizzazione dei microrganismi presentano una serie di svantaggi. L'importanza di un campionamento selettivo e rapido permette di ridurre al minimo gli svantaggi analitici, come per esempio la presenza di altri microrganismi o la presenza di cellule vitali ma non coltivabili (VBNC) che non possono essere rilevati mediante i metodi colturali classici. Se invece vengono utilizzati metodi molecolari, bisogna tener conto della presenza di potenziali inibitori.

DESCRIZIONE DEL BREVETTO

Nei laboratori Inail di Lamezia Terme è stato ideato e brevettato un sistema di gorgogliamento che consente un campionamento dell'aria, molto più efficace rispetto a quello ottenibile con altri dispositivi dello stesso tipo. Tale vantaggio è stato ottenuto progettando il dispositivo per concentrare grandi volumi di aria in piccole quantità di sospensione. In questo modo si ottengono due vantaggi fondamentali, il primo è quello di avere un campione molto concentrato e il secondo di limitare la perdita della sospensione. Il dispositivo di gorgogliamento consente di catturare in maniera selettiva *Legionella spp* e ridurre notevolmente i tempi di analisi post campionamento a poco più di 3 - 4 ore.

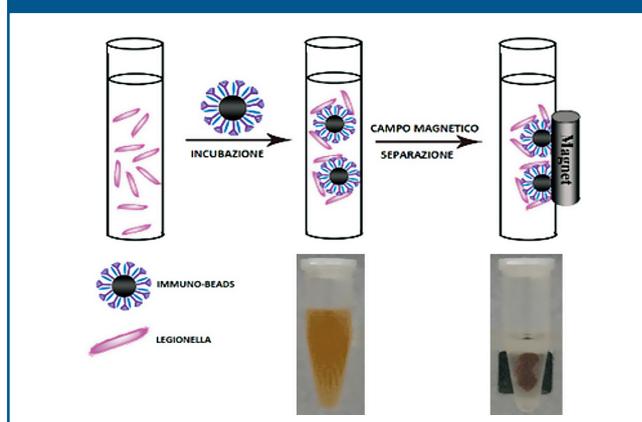
Tale effetto è ottenuto dalla presenza di una sospensione di beads immunomagnetiche (BIM), sensibilizzate con specifici anticorpi monoclonali anti-legionella, in grado di catturare in maniera selettiva e

specifici microrganismi di interesse che possono essere presenti nella matrice ambientale da analizzare (Figura 1).

Il sistema è costituito da una provetta monouso contenente la sospensione delle BIM, all'interno della quale è posto il sistema di gorgogliamento. La provetta viene collegata ad un campionatore, che consente di aspirare l'aria dal luogo in cui si intende campionare. Il collegamento del gorgogliatore avviene attraverso una trappola posta fra il gorgogliatore stesso e il campionatore, per evitare una perdita del liquido di campionamento e allo stesso tempo preservare il campionatore da un'eventuale contaminazione. Il vantaggio di questo sistema è che la sospensione batterica di interesse legata alle BIM, viene successivamente raccolta con l'utilizzo di un semplice magnete (Figura 2).

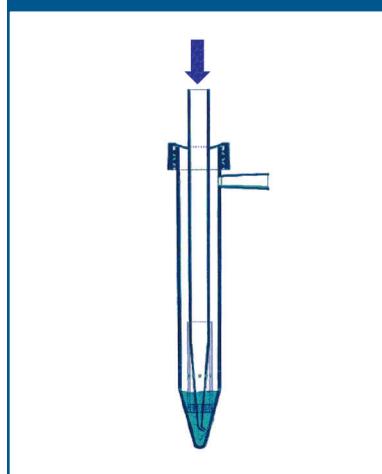
Il vantaggio di questo sistema è che la sospensione batterica di interesse legata alle BIM, viene successivamente raccolta con l'utilizzo di un semplice magnete (Figura 2).

Figura 2 Schema del sistema di cattura del microrganismo target e del recupero delle BIM



(Inail - Dipartimento di medicina, epidemiologia, igiene del lavoro e ambientale)

Figura 1 Schema del dispositivo brevettato



(Inail - Dipartimento di medicina, epidemiologia, igiene del lavoro e ambientale)

APPLICAZIONI PRATICHE

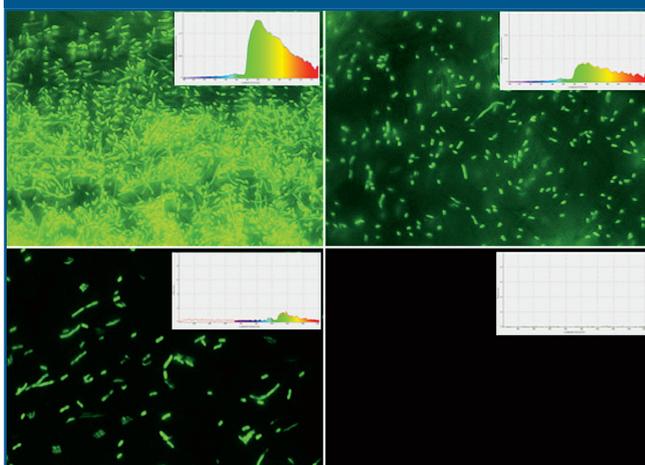
Questo innovativo sistema di campionamento è stato testato nei laboratori del Centro ricerca di Lamezia Terme, per verificarne sia la versatilità che l'affidabilità. Dopo aver campionato volumi noti a concentrazioni note di *Legionella pneumophila* ATCC 33152, i campioni sono stati testati con diverse tecniche analitiche, dalla semplice coltura su terreni specifici, alla polimerase chain reaction (PCR). Sono stati inoltre testati due metodi innovativi di analisi post campionamento, cioè un'ELISA immunomagnetica e una lettura al microscopio a fluorescenza con l'utilizzo di uno spettrometro.

Tutti i protocolli che abbiamo descritto sono metodi ancora in fase di sperimentazione, ma dimostrano la grande versatilità del sistema di campionamento da noi brevettato.

METODO CULTURALE

Dopo il campionamento con il sistema brevettato, un'aliquota del campione è stata piastrata su terreno selettivo per *Legionella* insieme alle BIM, previo lavaggio per eliminare gli altri microrganismi eventualmente presenti nella matrice aria; un'altra aliquota è stata trattata seguendo le procedure colturali standard, cioè prima di piastrarlo, il campione è stato trattato al calore (50°C per 30 minuti). Abbiamo notato una perdita di campione dopo il trattamento al calore, mentre il recupero con le BIM risulta pressoché del 100%.

Figura 3 Immagini in microscopia a fluorescenza di *L. pneumophila*. Il grafico mostra il segnale e l'integrale di calcolo



(Inail - Dipartimento di medicina, epidemiologia, igiene del lavoro e ambientale)

ANALISI IN FLUORESCENZA

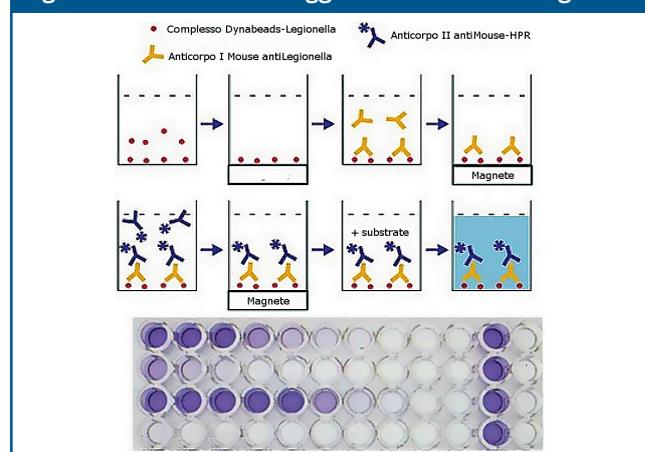
Un primo metodo sperimentale che abbiamo utilizzato per quantizzare la *Legionella* legata alle BIM, prevede l'utilizzo di un colorante fluorescente che si intercala nel DNA. Con l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza e di uno spettroradiometro, abbiamo misurato i fotoni emessi dalla fluorescenza, provando a quantizzare le cellule presenti sul vetrino (Figura 3). Il conteggio è stato effettuato misurando l'integrale compreso fra 510 nm - 560 nm.

POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Un altro metodo testato è la PCR. In questo caso è stata scelta una concentrazione alta di *Legionella pneumophila* ATCC 33152 post campionamento. Dopo il consueto lavaggio delle BIM per rimuovere gli even-

tuali contaminanti ambientali, è stata effettuata una PCR classica sia sul campione legato alle BIM, sia sul surnatante post raccolta, per verificare che non ci fosse una perdita di campione. Questo sistema comunque è prettamente qualitativo, cioè ci permette di valutare la presenza dei microrganismi d'interesse, ma non una quantizzazione.

Figura 4 Schema saggio ELISA Immunomagnetico



(Inail, Dipartimento medicina, epidemiologia, igiene del lavoro e ambientale)

ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) IMMUNO-MAGNETICA

Per quanto riguarda il sistema di quantizzazione in ELISA, il saggio è concepito come un'ELISA classica con un anticorpo anti-legionella e successivamente con un secondario marcato. La differenza consiste nell'utilizzo delle BIM per tenere ancorata la *Legionella* catturata e di magneti al neodimio per bloccare il campione durante i lavaggi (Figura 4). Questo sistema ci ha permesso di quantizzare la *Legionella* legata alle BIM a partire da una concentrazione di 10e7 CFU/ml, fino a 10e3 CFU/ml.

CONCLUSIONI

Lo sviluppo di questo dispositivo permetterà di ridurre i tempi di analisi post campionamento oltre che favorire l'utilizzo di numerosi protocolli analitici. Inoltre l'estrema versatilità nel suo utilizzo consente di modificare il microrganismo target sostituendo semplicemente l'anticorpo legato alle BIM. Il suo utilizzo permetterà in futuro di monitorare determinati agenti biologici in breve tempo, abbattendo i tempi di risposta delle analisi e favorendo un più rapido intervento dei protocolli di gestione del rischio.

PER ULTERIORI INFORMAZIONI

an.gioffre@inail.it - Centro Ricerca Inail Lamezia Terme

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

World Intellectual Property Organization (WIPO). Pub. No.: WO/2015/186090; Publication Date: 10.12.2015; Title: Bubbling device for sampling of environmental matrices. N. di deposito Nazionale: RM2014A000296.

PAROLE CHIAVE

Legionella pneumophila, campionamento bioaerosol.