

IL SISTEMA TOSCANO PER IL CONTROLLO E LA SALVAGUARDIA DELLE ACQUE DI BALNEAZIONE E DELL'AMBIENTE MARINO

Livorno, 4 maggio 2018 Sala Ferretti, Fortezza Vecchia

Le novità per gestione della stagione balneare 2018

DIREZIONE GENERALE

DIREZIONE TECNICA

**Settore
Comunicazione, informazione
e documentazione**

**Settore Indirizzo tecnico
delle attività**

**Settore
Sistema Informativo
Regionale Ambientale**

**Dipartimento
di Massa e Carrara**

UO BIOLOGIA

**Dipartimento
di Grosseto**

**Servizio
Versilia
Massaciuccoli**

**Dipartimento
di Pisa**

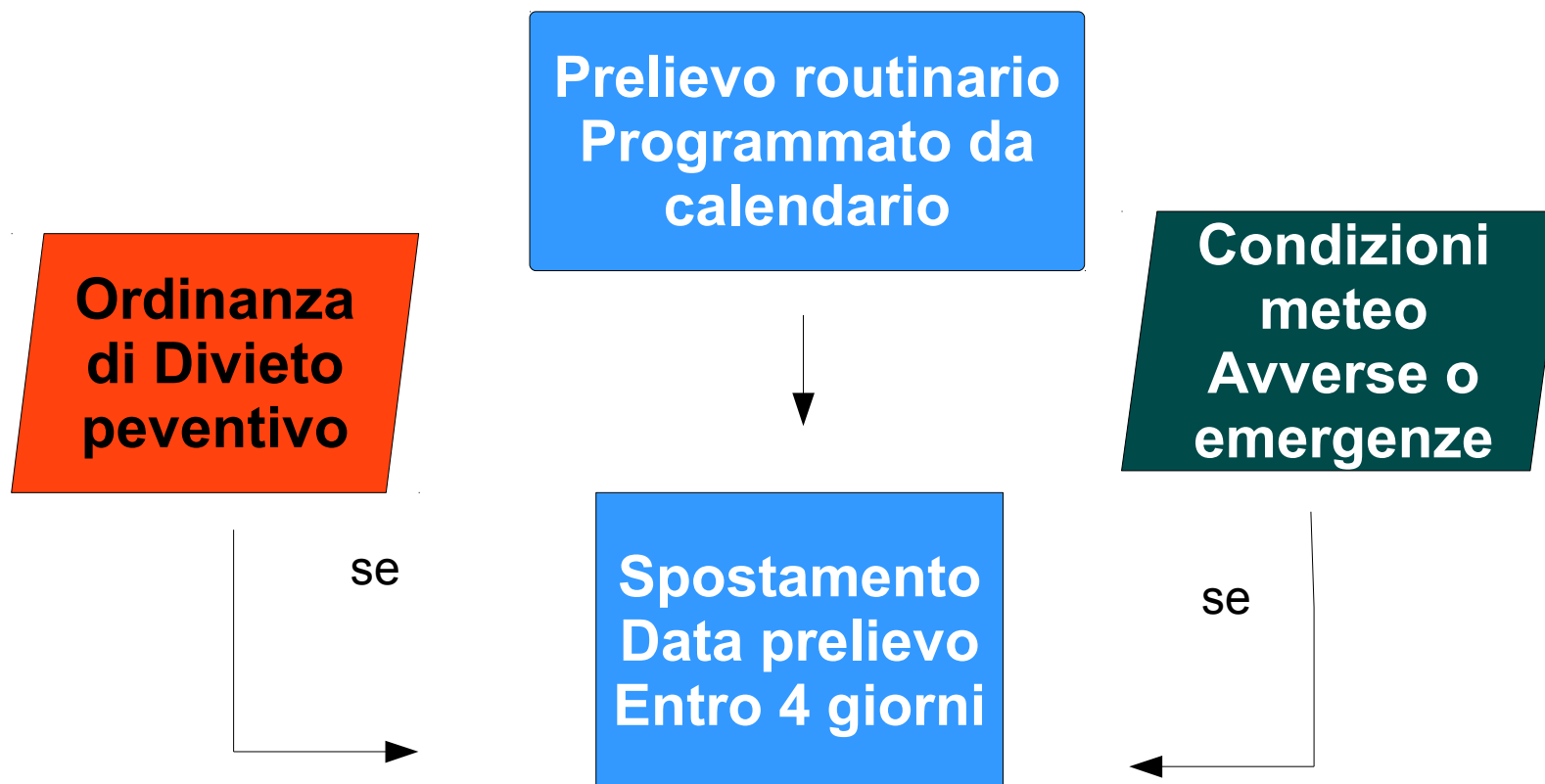
**Dipartimento
di Livorno**

**Dipartimento
di Piombino-Elba**

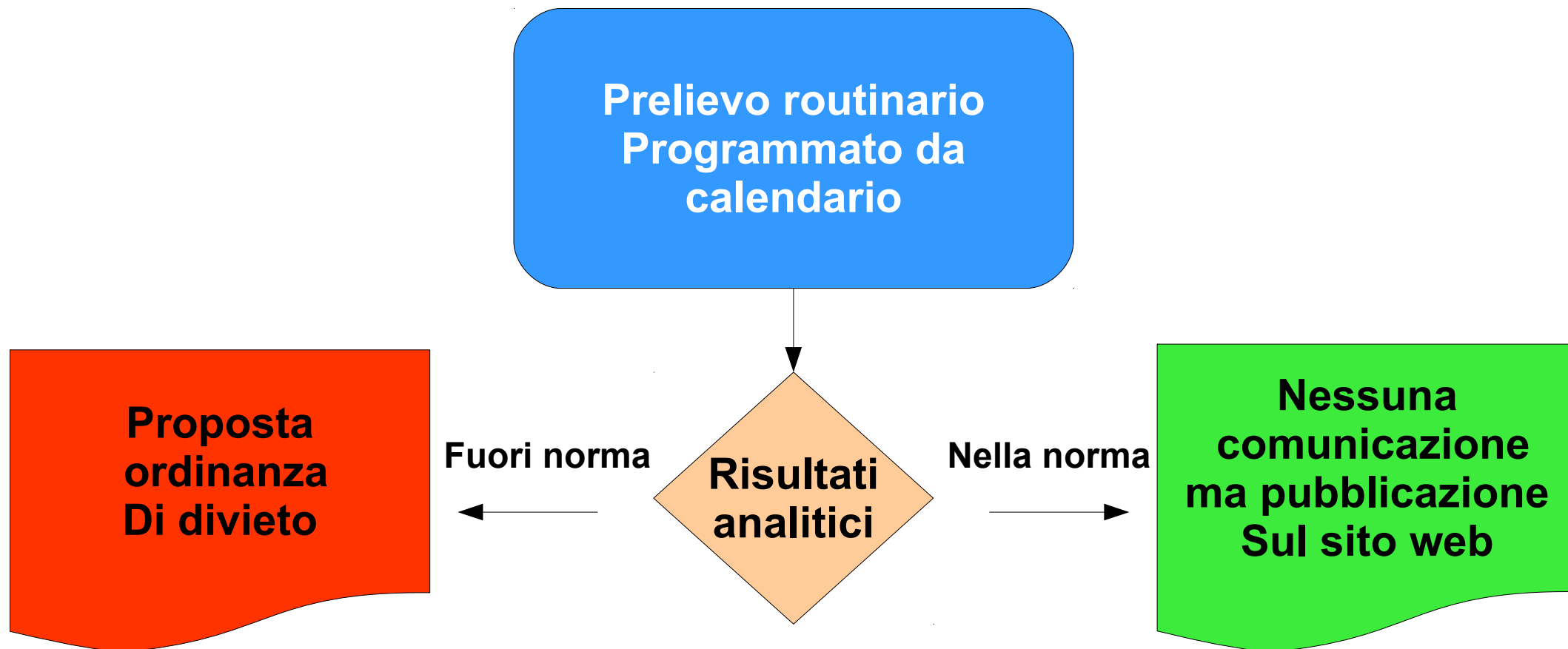
Video campionamento e informazione cittadini

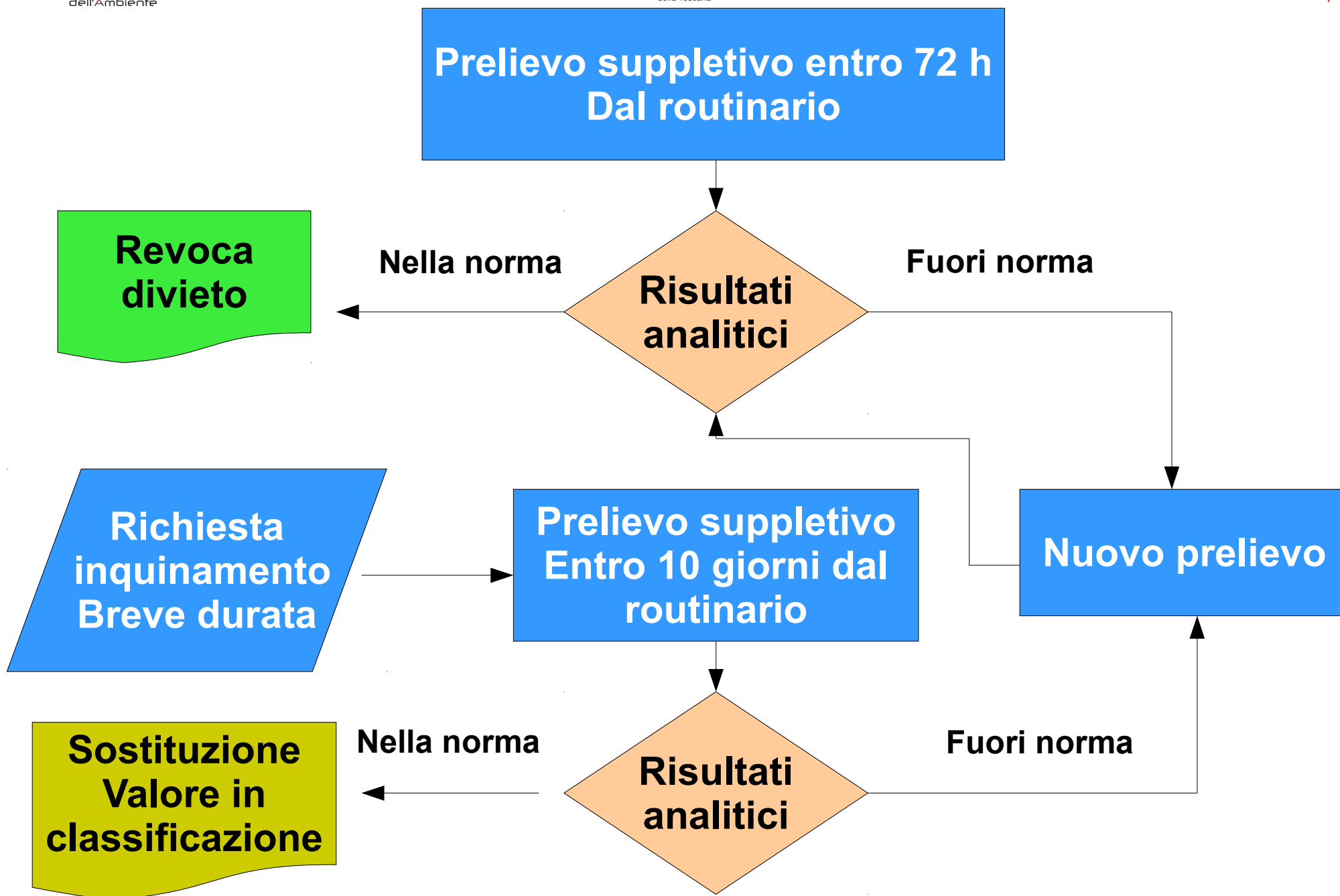


ACQUE DI BALNEAZIONE CONTROLLI PROGRAMMATI



ACQUE DI BALNEAZIONE CONTROLLI PROGRAMMATI





VIDEO INDICATORI COME VENGONO COMUNICATI I FUORI NORMA

INQUINAMENTO PRESUNTO

**Comunicazione,
da Gestore,
Consorzio,
Comune**

**Presunto
Inquinamento
accidentale**

**Comunicazione
Cittadini e/o
Operatori ARPAT**

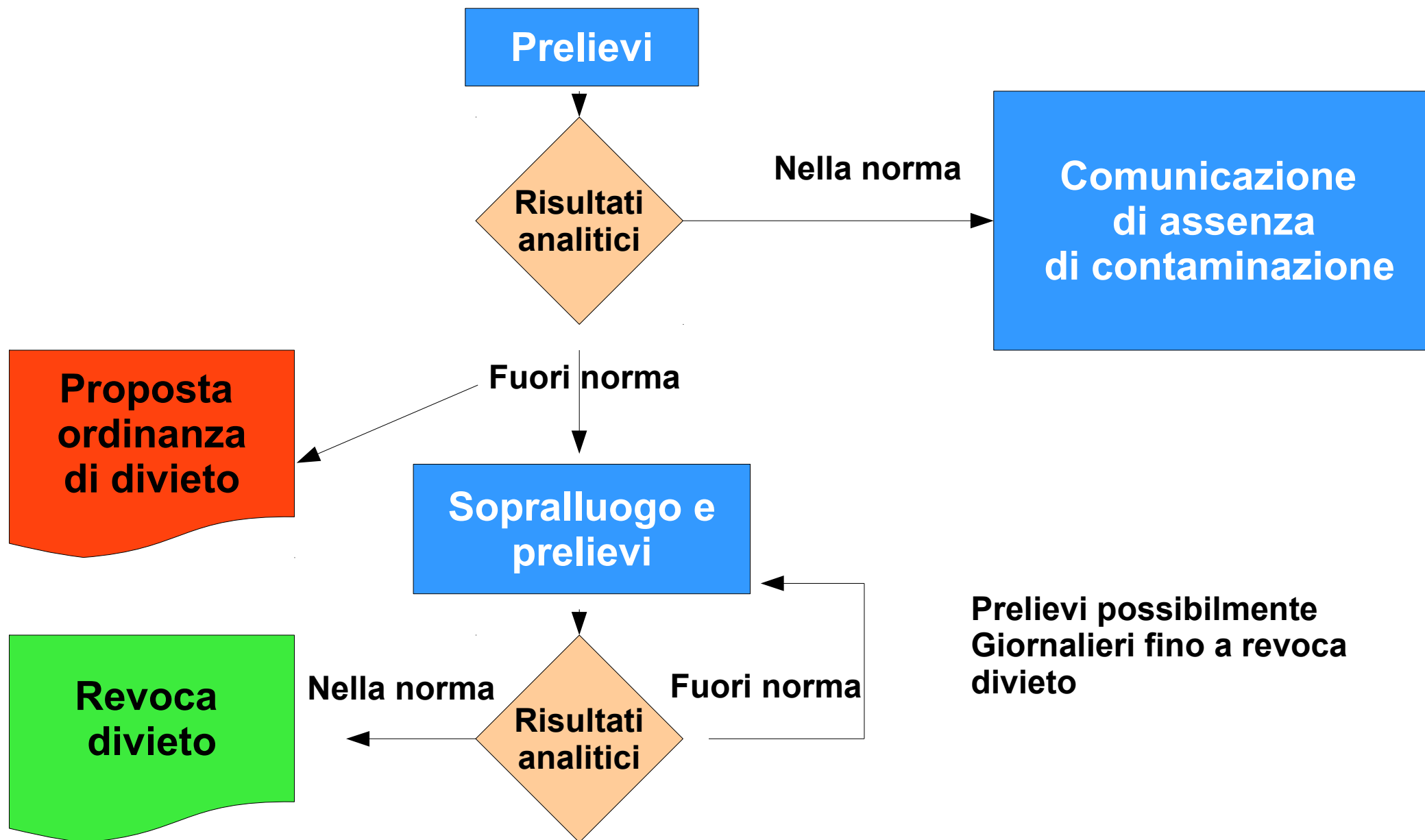
**Sopralluogo
Rilievi fotografici e
prelievi**

**Evidenza visiva di
contaminazione**

**Proposta di
Ordinanza di divieto**

- Nel punto di immissione di contaminanti
- Nel punto di prelievo area interessata a distanza crescente
- Nel punto di prelievo area limitrofa

INQUINAMENTO PRESUNTO



INQUINAMENTO PRESUNTO CON ORDINANZA DI DIVIETO PREVENTIVO

Comunicazione,
da Gestore,
Consorzio,
Comune

Ordinanza
di divieto
preventivo

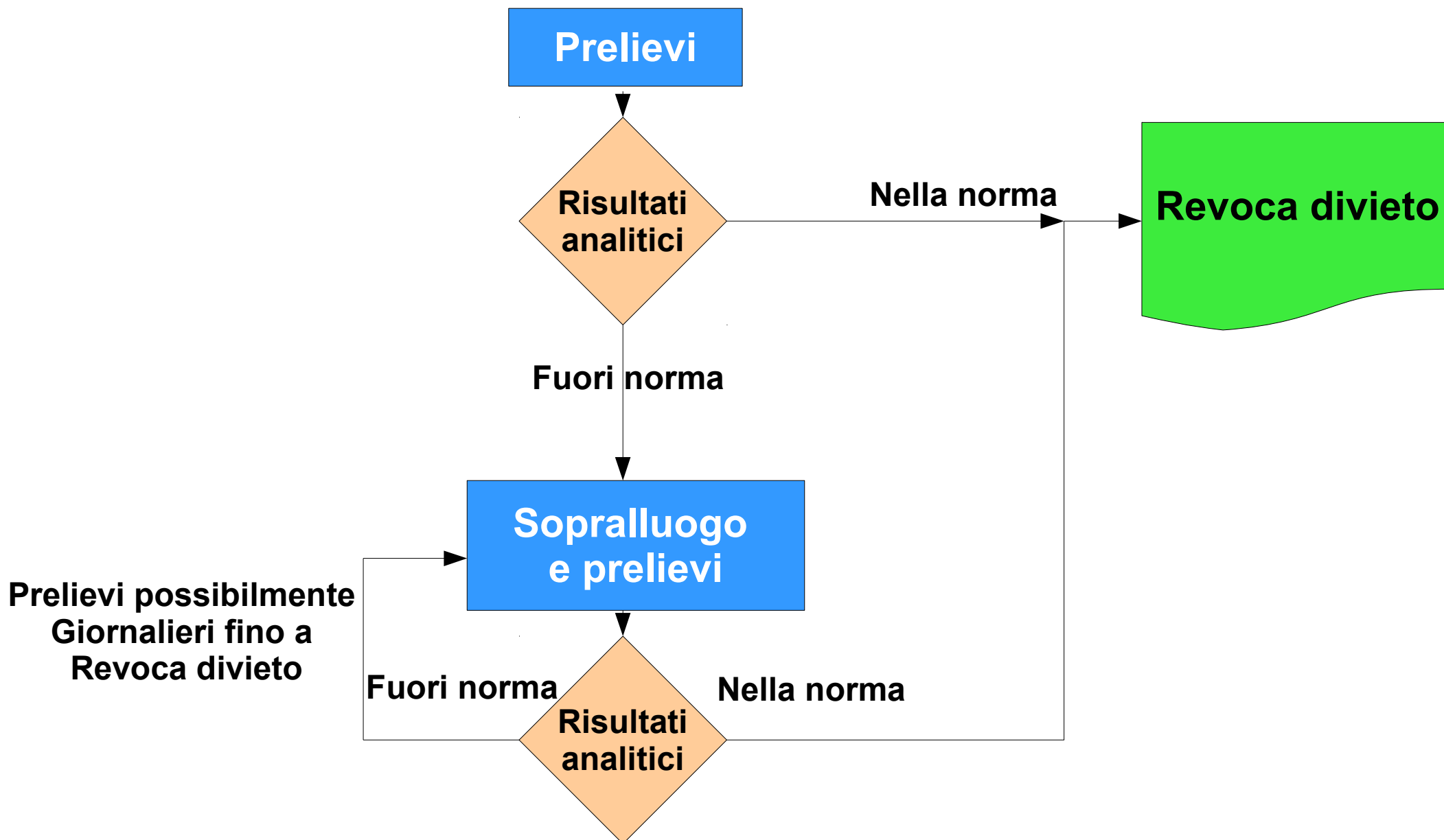
Spostamento prelievo
Routinario entro 4 giorni
Dalla data del calendario

Presunto
Inquinamento
accidentale

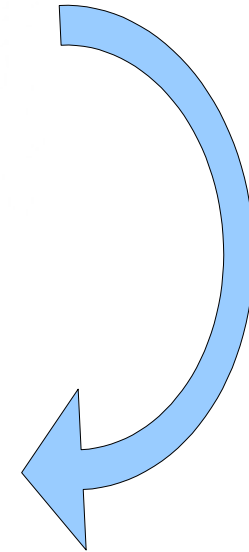
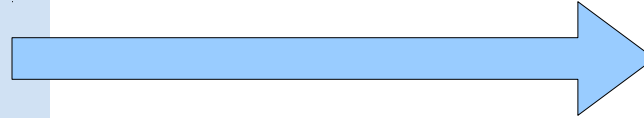
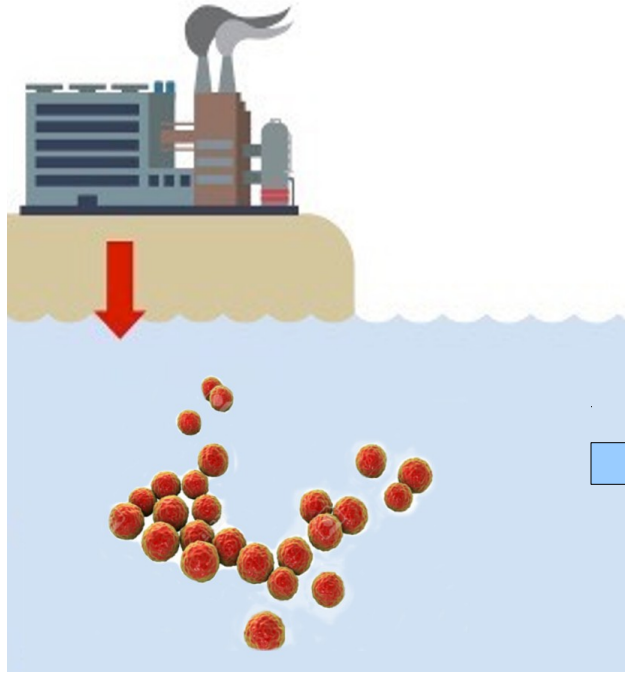
Sopralluogo
Rilievi fotografici e
prelievi

- Nel punto di immissione di contaminanti
- Nel punto di prelievo area interessata a distanza crescente
- Nel punto di prelievo area limitrofa

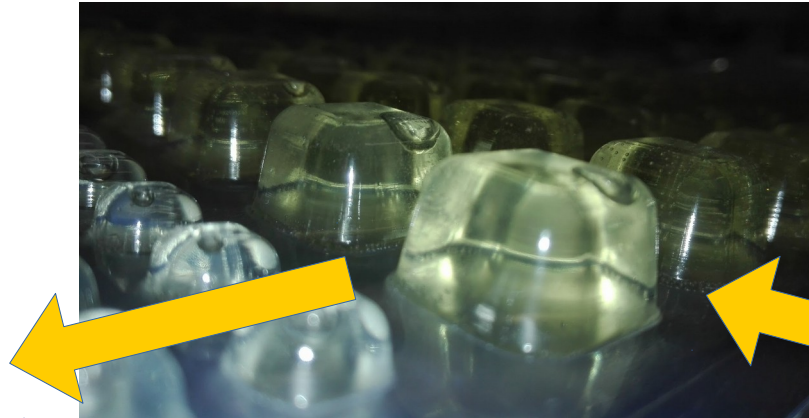
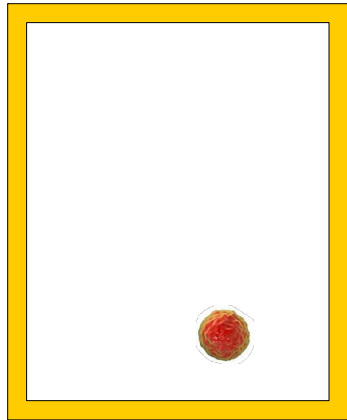
INQUINAMENTO PRESUNTO CON ORDINANZA DI DIVIETO PREVENTIVO



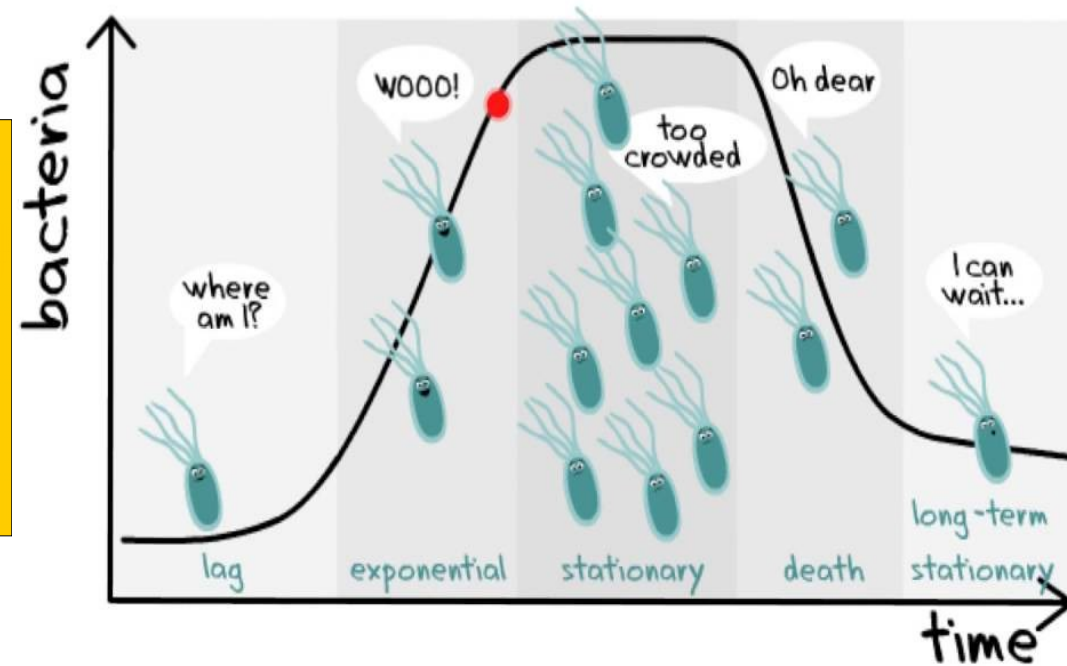
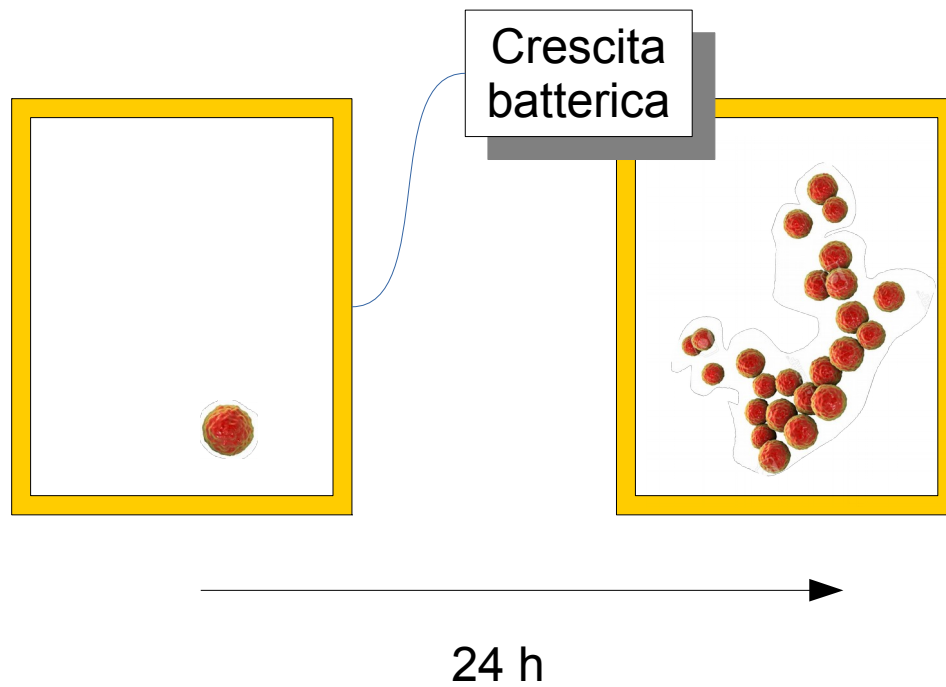
Metodo culturale utilizzato Enterolert-E



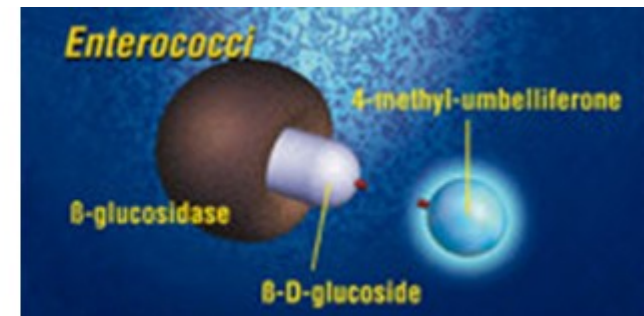
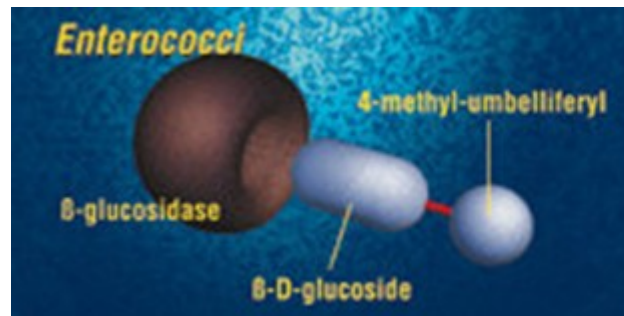
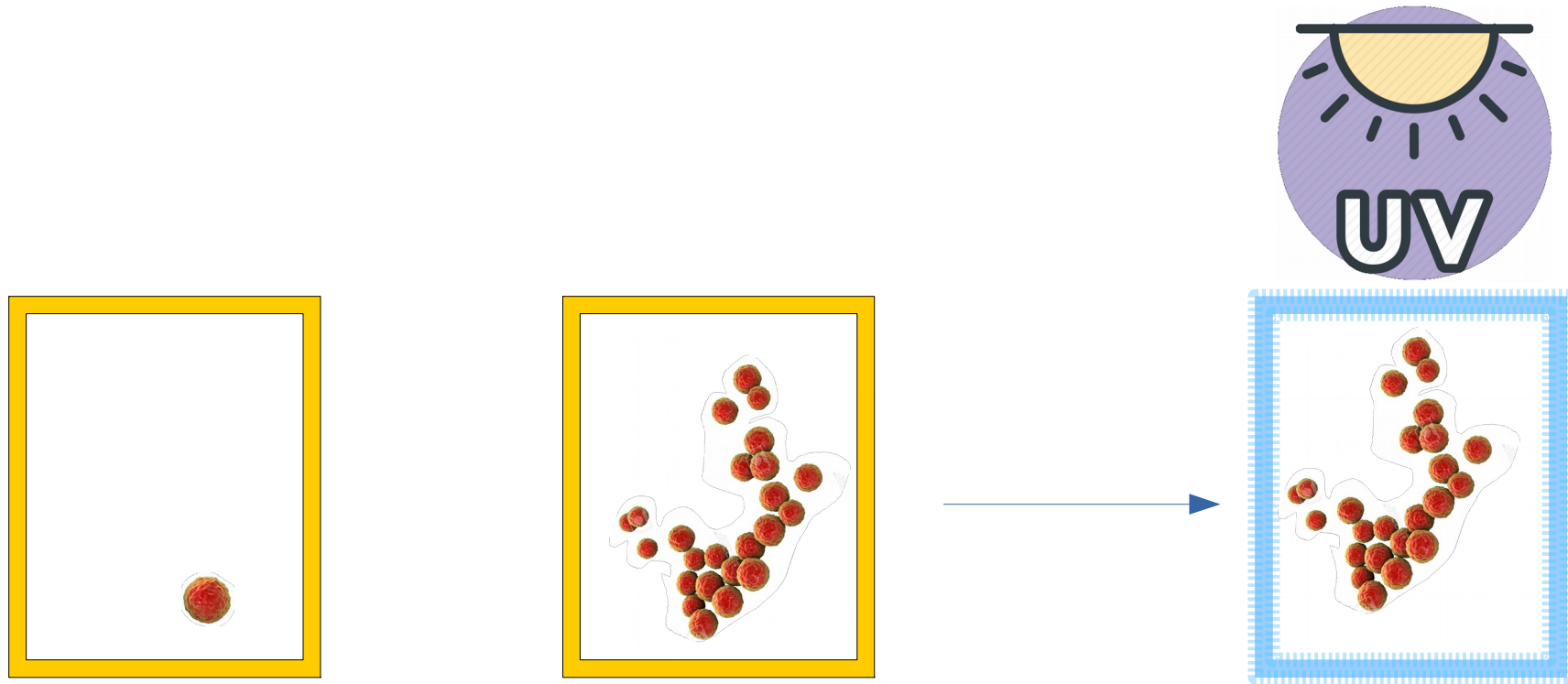
Enterolert-E



Enterolert-E



Enterolert-E





IDEX Quanti-Tray®/2000
MPN Table (per 100mL) with 95% Confidence Limits

Positive Large Wells	Positive Small Wells	MPN	95% Confidence Lower Limit	95% Confidence Upper Limit
0	0	0	0.0	3.7
0	1	1.0	0.0	3.7
0	2	2.0	0.3	5.6
0	3	3.0	0.6	7.3
0	4	4.0	1.1	8.9
0	5	5.0	1.7	10.5
0	6	6.0	2.3	12.1
0	7	7.0	2.9	13.7
0	8	8.0	3.7	15.3
0	9	9.0	4.5	15.8
0	10	10.0	5.2	16.9
0	11	11.0	5.9	18.5
0	12	12.0	6.9	20.1
0	13	13.0	7.8	21.2
0	14	14.1	8.6	21.9
0	15	15.1	9.0	22.4
0	16	16.1	9.6	24.9
0	17	17.1	10.5	25.7
0	18	18.1	11.5	26.9
0	19	19.1	12.5	28.6
0	20	20.2	13.2	29.3
0	21	21.2	13.9	30.5
0	22	22.2	14.5	31.8
0	23	23.3	15.7	33.1
0	24	24.3	16.4	34.2
0	25	25.3	17.6	35.2
0	26	26.4	18.3	36.5
0	27	27.4	19.5	37.7
0	28	28.4	19.7	38.6
0	29	29.5	21.0	39.9
0	30	30.5	21.7	41.2
0	31	31.5	22.5	42.3
0	32	32.6	23.9	43.4
0	33	33.6	24.6	44.4
0	34	34.7	25.4	45.7
0	35	35.7	26.2	46.8
0	36	36.8	27.7	48.0
0	37	37.8	28.5	49.0
0	38	38.9	29.2	50.3
0	39	40.0	30.0	51.2
0	40	41.0	30.8	52.8
0	41	42.1	31.6	53.7
0	42	43.1	32.3	54.7
0	43	44.2	34.1	56.1
0	44	45.3	34.9	57.1

Positive Large Wells	Positive Small Wells	MPN	95% Confidence Lower Limit	95% Confidence Upper Limit
25	0	33.6	22.0	49.9
25	1	35.0	22.9	51.2
25	2	36.4	23.8	52.6
25	3	37.9	25.5	54.0
25	4	39.3	26.5	55.9
25	5	40.8	28.3	57.3
25	6	42.2	29.3	59.0
25	7	43.7	30.3	60.7
25	8	45.2	31.3	62.5
25	9	46.7	32.3	64.2
25	10	48.2	34.4	66.0
25	11	49.7	35.4	67.3
25	12	51.2	36.5	69.0
25	13	52.7	37.6	70.7
25	14	54.3	38.7	72.4
25	15	55.8	40.9	74.0
25	16	57.3	42.0	75.9
25	17	58.9	43.1	77.6
25	18	60.5	45.5	79.5
25	19	62.0	46.7	81.2
25	20	63.6	47.8	83.0
25	21	65.2	49.0	84.6
25	22	66.8	50.2	86.2
25	23	68.4	51.5	87.4
25	24	70.0	54.0	89.5
25	25	71.7	55.3	91.6
25	26	73.3	56.6	93.9
25	27	75.0	57.8	96.1
25	28	76.6	59.1	96.1
25	29	78.3	60.4	96.6
25	30	80.0	61.7	109.0
25	31	81.7	64.6	109.6
25	32	83.3	65.9	109.6
25	33	85.1	67.3	109.2
25	34	86.8	68.6	107.3
25	35	88.5	70.0	106.1
25	36	90.2	71.4	111.4
25	37	92.0	72.8	112.3
25	38	93.7	74.2	114.9
25	39	95.5	77.4	116.4
25	40	97.3	78.9	118.3
25	41	99.1	80.2	120.4
25	42	100.9	81.8	121.9
25	43	102.7	83.2	124.2
25	44	104.5	84.7	126.0

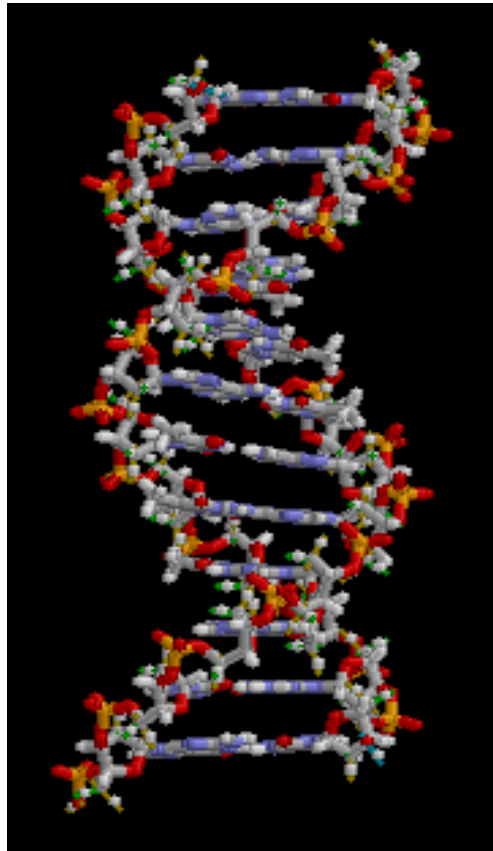


Method 1609.1: Enterococci in Water by TaqMan[®] Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) with Internal Amplification Control (IAC) Assay

April 2015



GLI EVENTI CHE HANNO DETERMINATO LA SCOPERTA DELLA PCR



1953

Watson e Crick

1957

Arthur Kornberg,

dimostrò che era possibile sintetizzare un nuovo DNA con la stessa composizione di basi di un DNA di partenza in una provetta che conteneva tre tipi di sostanze:

i quattro desossiribonucleosidi trifosfati dATP, dCTP, dGTP e dTTP (molecole contenenti ciascuna una base azotata legata al desossiribosio, a sua volta legata a tre gruppi fosfato);
l'enzima DNA polimerasi;
un DNA che serviva da stampo per guidare l'ingresso dei nucleosidi.

1983 **Kary Mullis** poneva le basi per una grande innovazione tecnologica: la reazione a catena della Polimerasi PCR

LA REAZIONE A CATENA DELLA POLIMERASI SI DEFINISCE COME

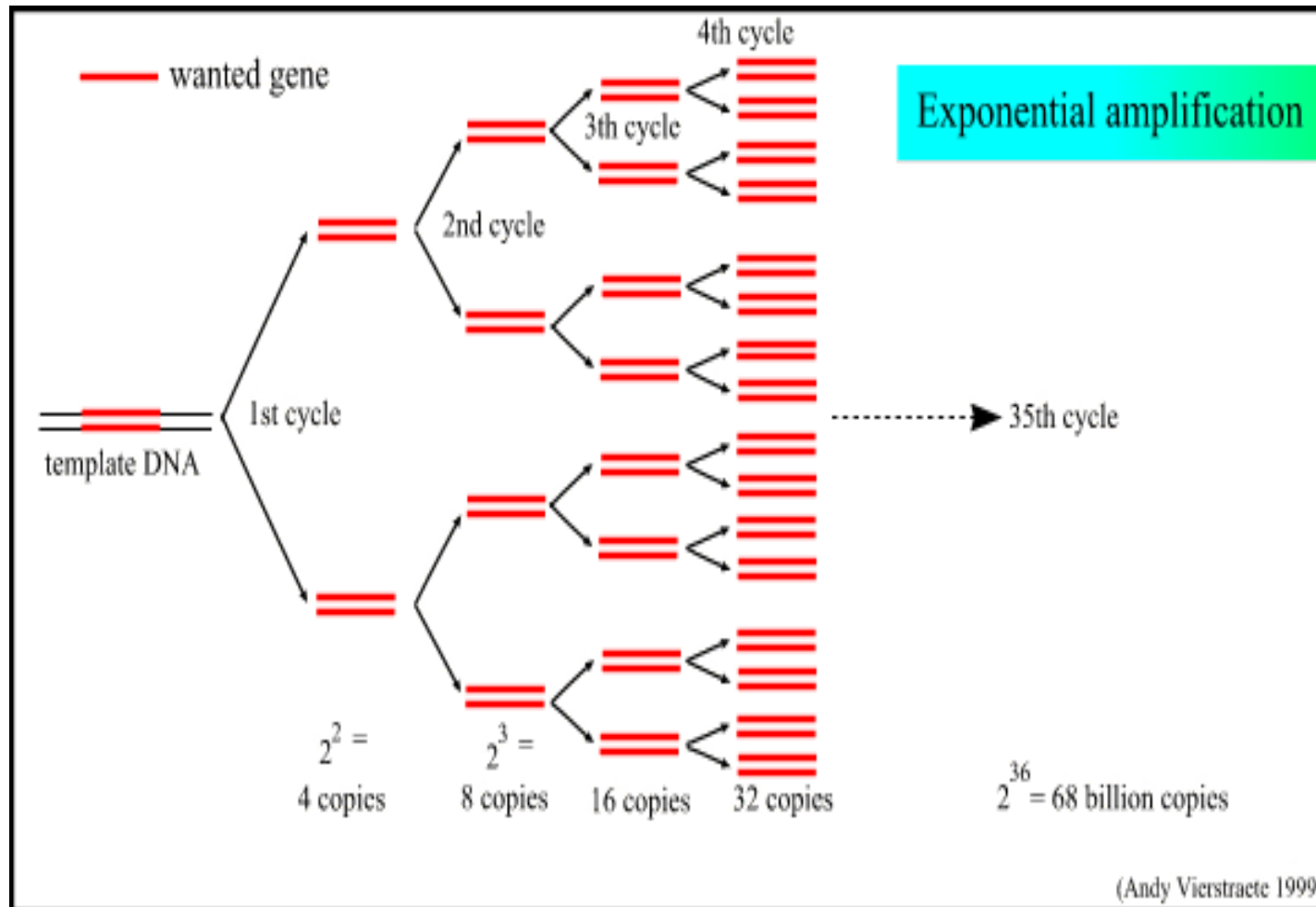
**UNA REAZIONE DI AMPLIFICAZIONE *IN VITRO* DI
UN SEGMENTO SPECIFICO DI DNA (SEQUENZA
TARGET) PER MEZZO DI UNA DNA POLIMERASI**

**NELLA REAZIONE SONO COINVOLTI TRE
SEGMENTI DI ACIDI NUCLEICI:**

- 1) LO STAMPO DI DNA A DOPPIA ELICA CHE
DEVE ESSERE AMPLIFICATO (SEQUENZA
TARGET)**
- 2) DUE PRIMERS OLIGONUCLEOTIDICI A
SINGOLO FILAMENTO**

I PRIMERS SI ACCOPPIANO IN MANIERA SPECIFICA, ATTRAVERSO LA REAZIONE DI IBRIDAZIONE, CON SEGMENTI COMPLEMENTARI IN POSIZIONE SIMMETRICAMENTE OPPOSTA, CON LA MOLECOLA DEL DNA STAMPO E FORNISCONO GLI ELEMENTI DI INNESCO PER L'AGGIUNTA DI NUCLEOTIDI E LA SINTESI DI UN FILAMENTO DI DNA COMPLEMENTARE AL DNA STAMPO MEDESIMO

**RIPETENDO NUMEROSE VOLTE QUESTA
REAZIONE SI POSSONO OTTENERE MILIONI DI
MOLECOLE DI DNA IDENTICHE A QUELLE DEL
DNA DI PARTENZA**

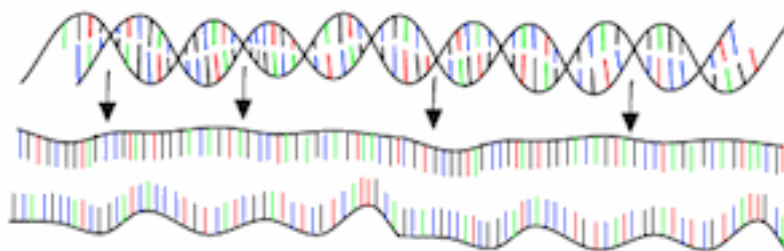


Source: Andy Vierstraete,
<http://users.ugent.be/~avierstr/index.html>

**I PASSAGGI PER EFFETTUARE QUESTA
REAZIONE DI AMPLIFICAZIONE ESPONENZIALE
SONO RAPPRESENTATI NELLA PROSSIMA
DIAPOSTIVA**

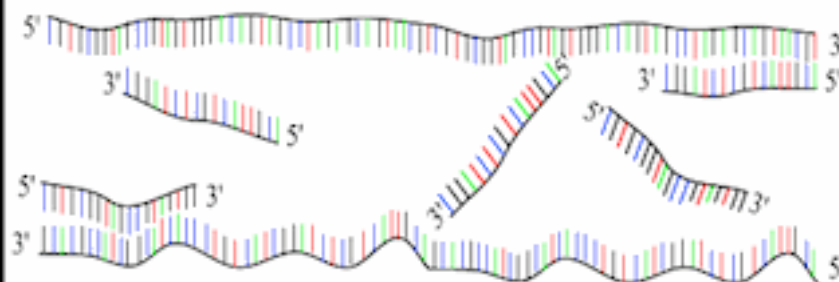
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

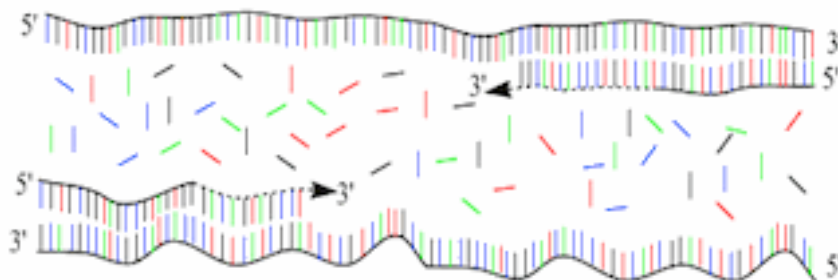
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse
primers !!!



Step 3 : extension

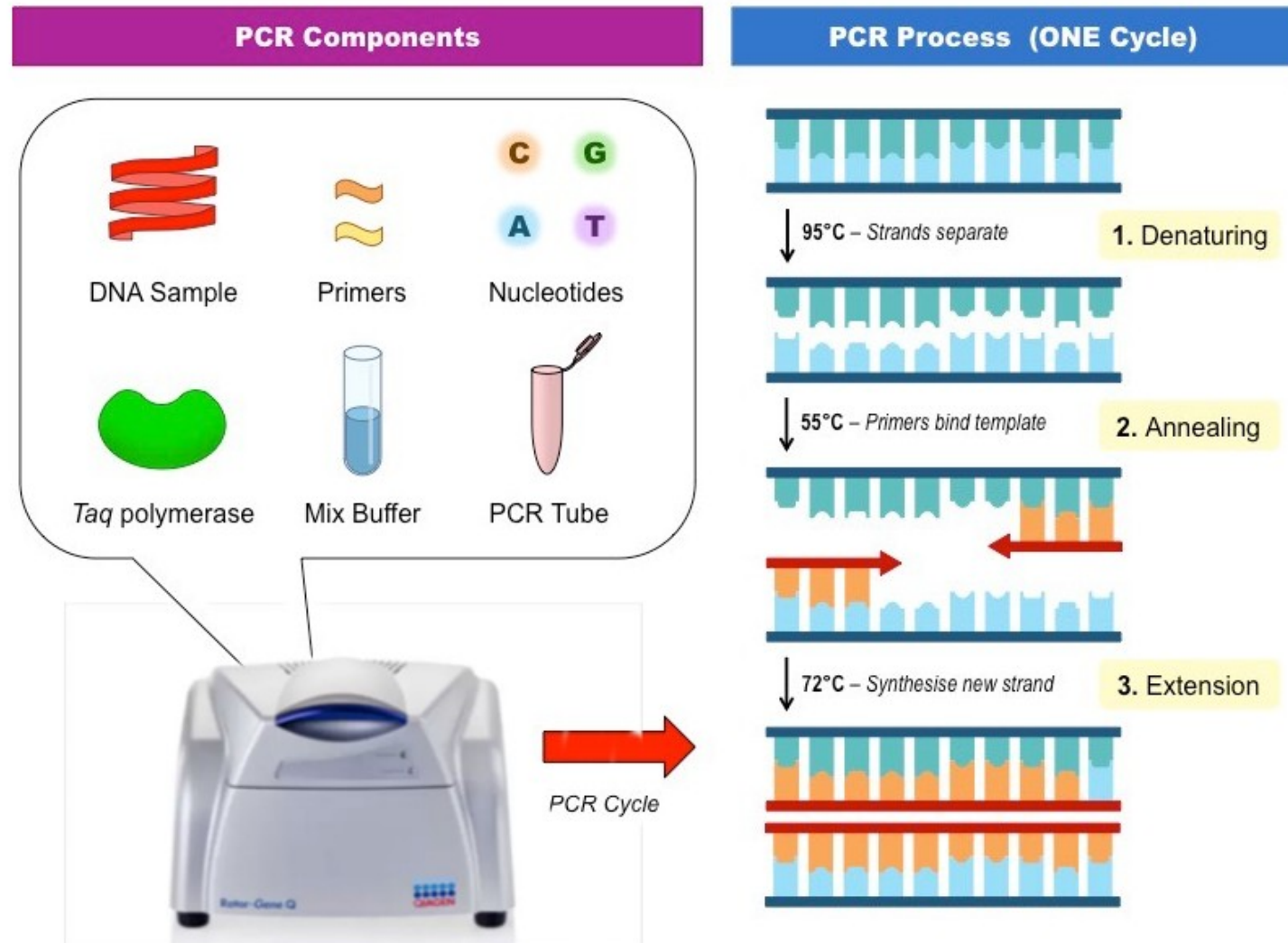
2 minutes 72 °C

only dNTP's

(Andy Vierstraete 1999)

Source: Andy Vierstraete,
<http://users.ugent.be/~avierstr/index.html>

Ricerca quantitativa di Enterococchi mediante qPCR



La valutazione quantitativa dell'acido nucleico avviene tramite sonda dual-labeled come la sonda Taqman

Tale sonda ibridizza un tratto di genoma interno al frammento di DNA amplificato dalla coppia di primers.

All'estremità 5' della sonda è legato il Reporter, fluorocromo ad alta energia.
All'estremità 3' è legato il Quencher, fluorocromo a bassa energia.

Quando i fluorocromi sono legati alla sonda, i fotoni emessi dal Reporter sono assorbiti dal Quencher, che ha minore livello energetico.

Nella fase di denaturazione non vi è emissione di fluorescenza.

Durante l'annealing, i primers e la sonda si uniscono ai tratti di DNA ad essi complementari.

Reporter e Quencher sono ancora legati alla sonda.

Nella fase di estensione:

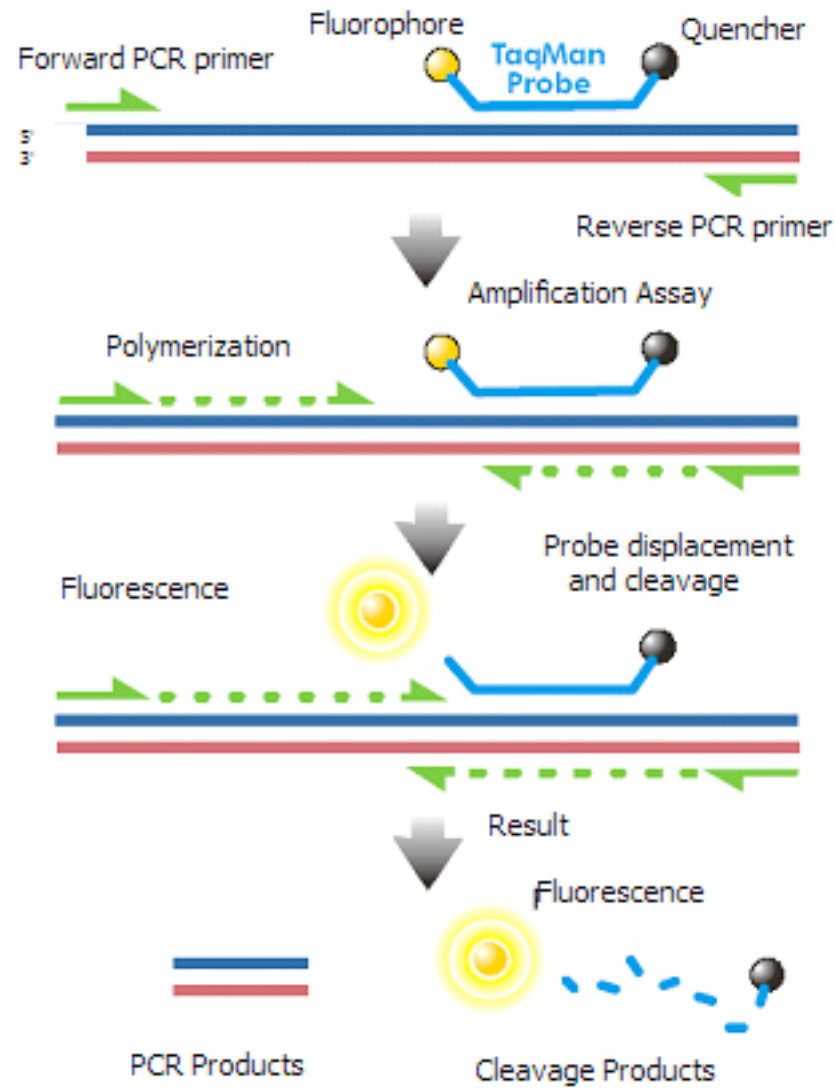
l'attivazione della Taq e il conseguente appaiamento dei nucleotidi trifosfati raggiunge la sonda.

Il Reporter, all'estremità 5', si stacca dalla sonda.

I fotoni del Reporter non sono più assorbiti dal Quencher ed emettono fluorescenza.

Quando la sonda emette fluorescenza si ha la conferma in tempo reale dell'amplificazione del tratto di DNA ricercato.

L'esame di Real Time PCR avviene in termociclatori in grado di registrare la fluorescenza



Source: <http://bit.ly/XGvVoP>

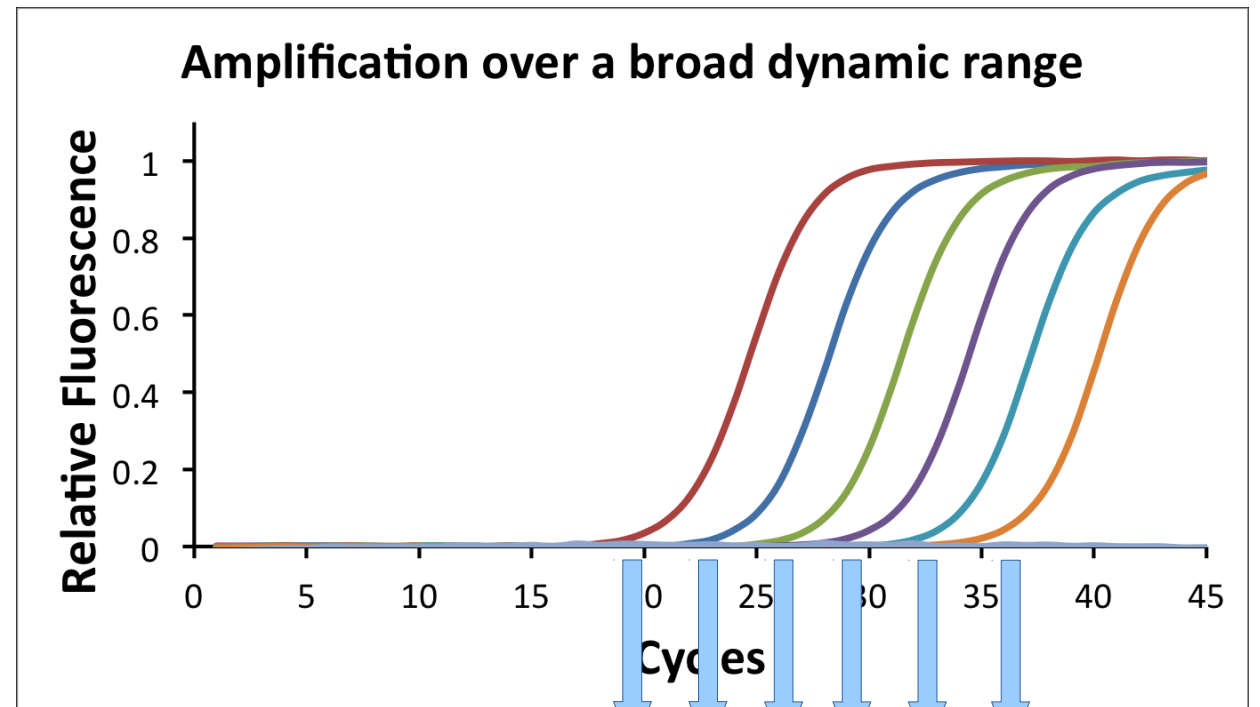
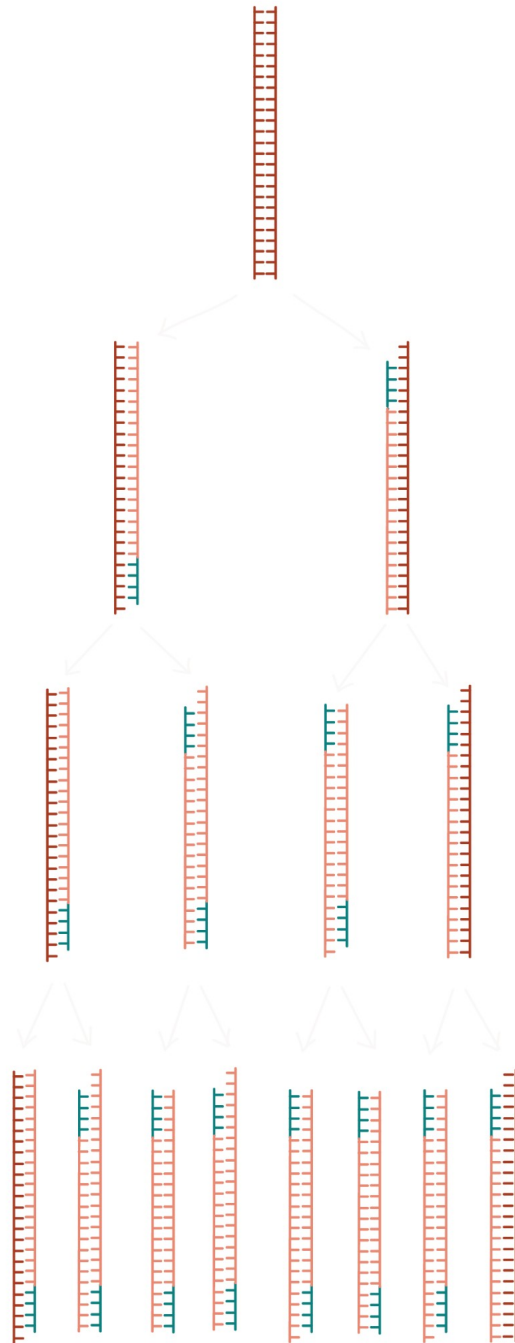
VALUTAZIONE DEI RISULTATI

La fluorescenza emessa in fase di amplificazione è registrata da software dedicati che visualizzano il segnale di fluorescenza come curve di amplificazione.

Le curve sono riportate su monitor collegati al termocicizzatore.

L'emissione di fluorescenza è direttamente proporzionale alla quantità di DNA presente.

Per elevate concentrazioni di DNA le curve di amplificazione si registrano già dopo i primi cicli di PCR.



Quantificazione del DNA nel campione

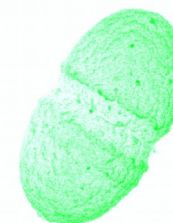
Applicazione del metodo EPA 1609.1

- Il metodo EPA prevede la stima di cellule di *Enterococcus* spp. indipendentemente dalla loro vitalità

Cellule Non Vitali



Cellule Vitali



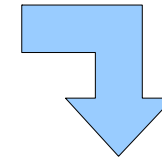
Metodo	Cellule Non Vitali		Cellule Vitali	
	Molecolare	Colturale	Molecolare	Colturale



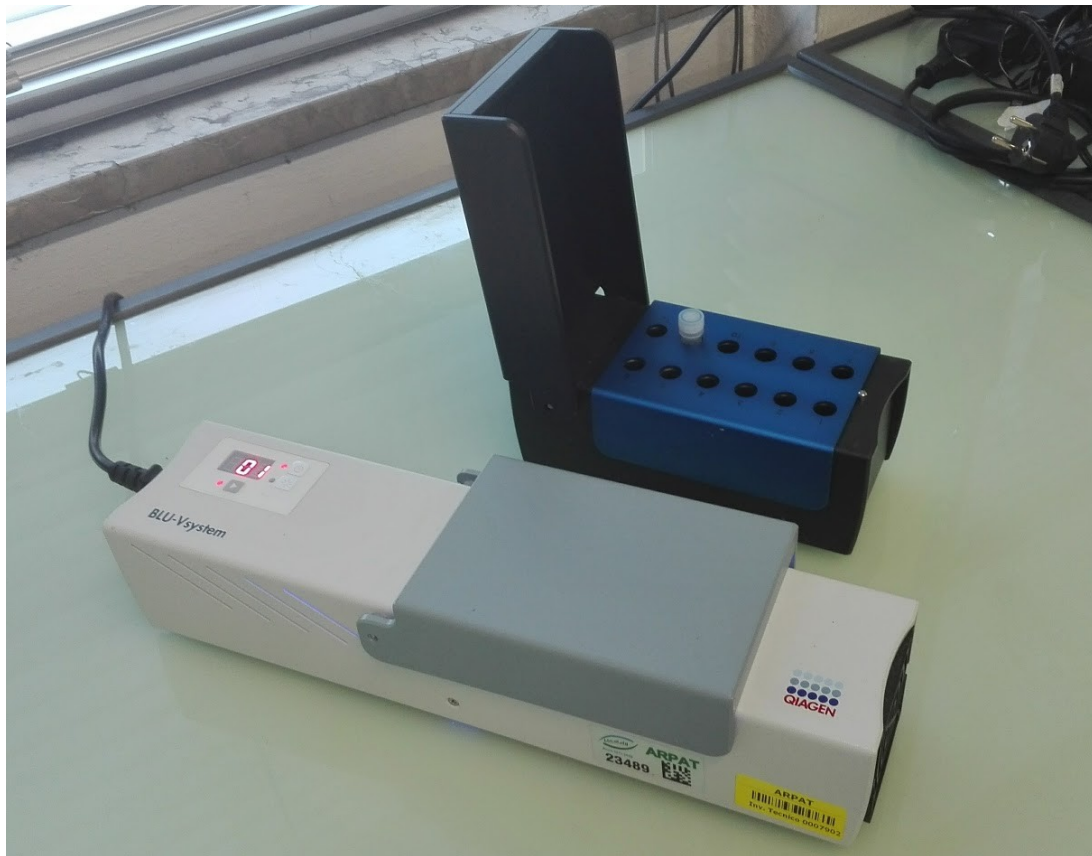
SOVRASTIMA DELLE CELLULE PRESENTI NEL CAMPIONE

Modifiche ad metodo EPA 1609.1

- BLU-V Viability PMA (Propidium Monoazide) Kit



Degradazione batteri non vitali

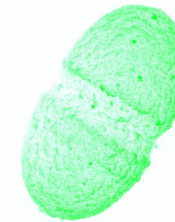


Modifiche apportate al metodo EPA 1609.1

Cellule Non Vitali

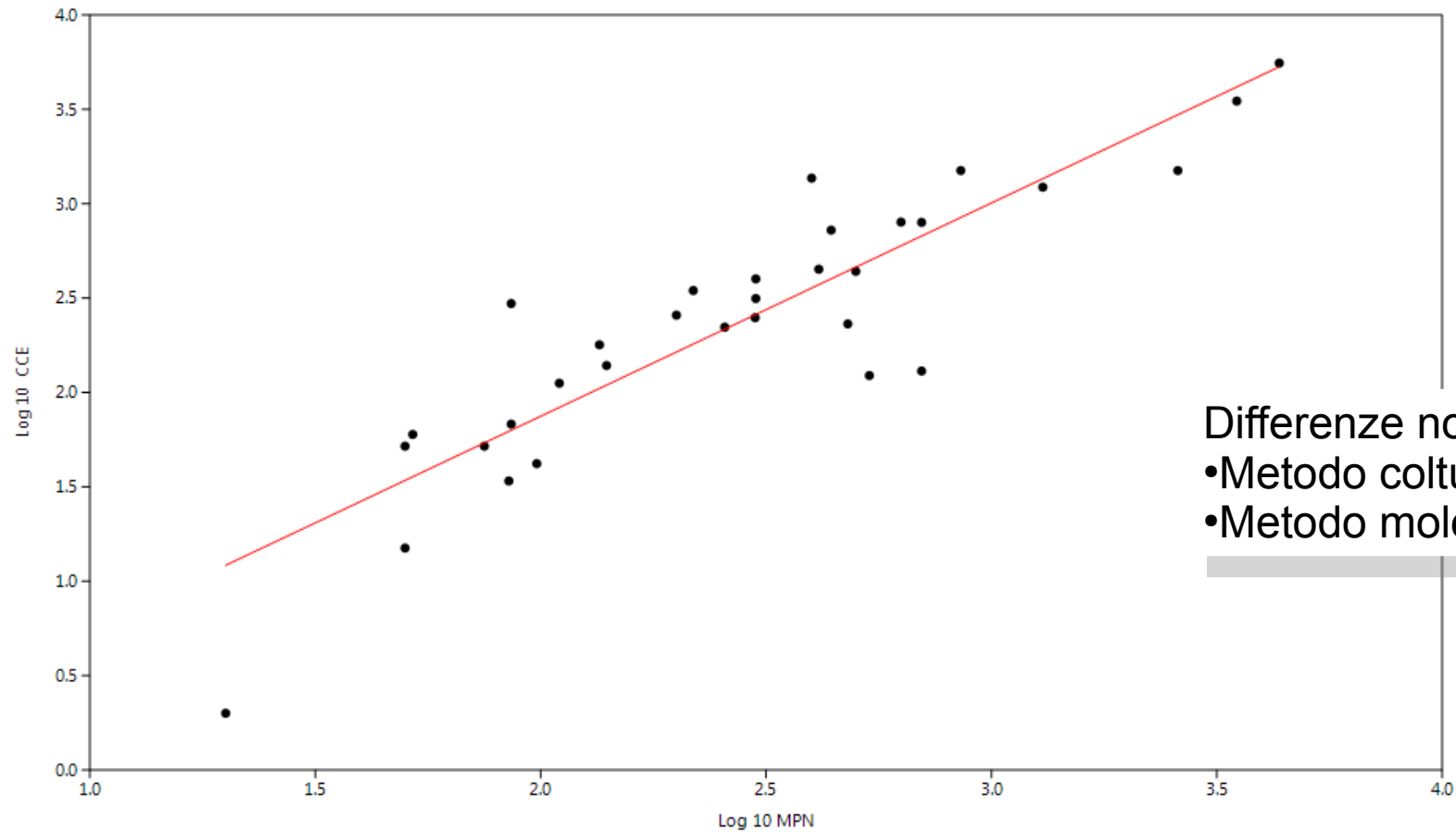


Cellule Vitali



Metodo	Molecolare	Colturale	Molecolare	Colturale

Modifiche apportate al metodo EPA 1609.1



Differenze non significative tra:

- Metodo colturale
- Metodo molecolare

Ricerca quantitativa di Enterococchi mediante qPCR

qPCR

Amplificazione DNA

Risposta dopo 4 ore dal campionamento

Enterolert-E

Metodo MPN

Crescita Batterica

Risposta in 24 ore dal campionamento