



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

SCUOLA DI MEDICINA DI TORINO

CORSO DI LAUREA IN TECNICHE DI LABORATORIO BIOMEDICO

TESI DI LAUREA

**ANALISI MICROBIOLOGICA DELLE ACQUE:
CONFRONTO TRA IL METODO UNI/EN/ISO 9308-1 DEL 2014 E
I METODI APAT-CNR-IRSA 7010C E 7030C DEL 2003.**

**CANDIDATO
Fabio Rocca**

Anno Accademico 2014-15

ACQUA DESTINATA AL CONSUMO UMANO E SALUTE

- In Europa si contano 2,5 milioni di casi malattie gastrointestinali, 2% legate all'acqua potabile
- D. Lgs n. 31 del 2 febbraio 2001:
 - ✓ Definisce l'acqua destinata al consumo umano
 - ✓ Definisce i controlli da effettuare: - interni (gestore dell'impianto idrico)
- esterni (AUSL o Azienda Sanitaria Locale)
- Le attività di laboratorio delle AUSL sono delegate all'ARPA (Agenzia per la Protezione Ambientale)
- L'ARPA deve garantire il controllo analitico della qualità attraverso due procedure:
 - Accreditamento → competenza tecnica e gestionale a svolgere determinati tipi di analisi,
 - Certificazione → prevede l'utilizzo delle procedure presenti nelle norme di riferimento ISO.

MICROORGANISMI INDICATORI

I controlli microbiologici sono svolti ricercando organismi definiti indicatori.

Principali indicatori di contaminazione fecale sono *Escherichia coli* e batteri coliformi totali.

Indicatori di contaminazione fecale	
Parametro	Concentrazione (numero/100ml)
Escherichia coli	0
Coliformi totali	0

Batteri coliformi:

- Specie principali: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*,
- E. coli* rappresenta il 99% delle specie di origine fecale,

Escherichia coli:

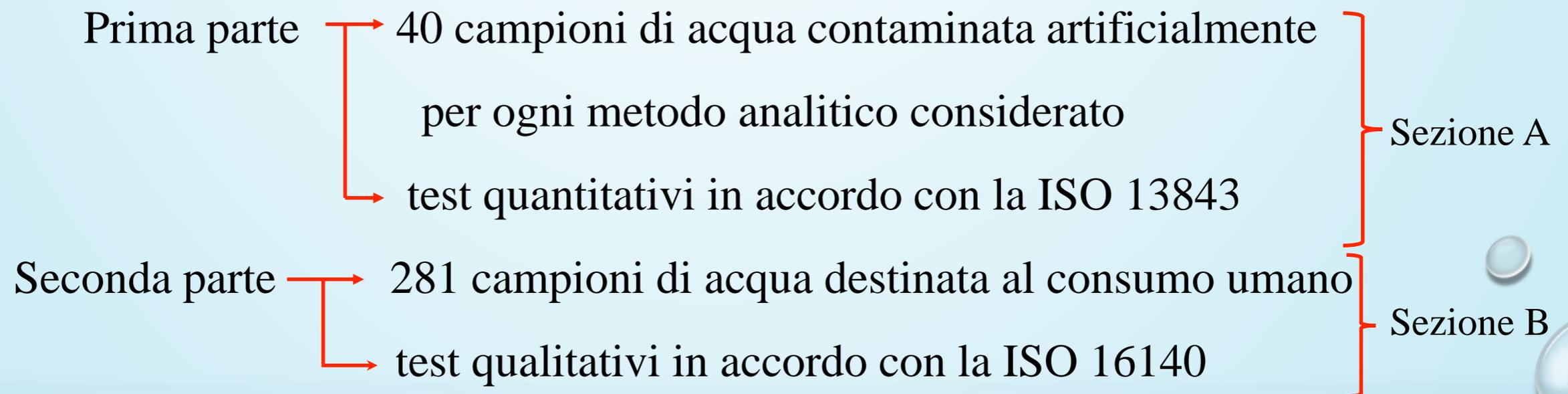
- Bacillo commensale predominante nella flora microbica intestinale
- Indicatore primario di contaminazione fecale

SCOPO DEL LAVORO

- Il lavoro è stato svolto nel laboratorio di microbiologia dell'ARPA Valle d'Aosta e ha previsto il confronto:

1. Metodo ISO 9308-1 del 2014 con la precedente metodica APAT-CNR-IRSA 7030C relativa alla ricerca di *Escherichia coli*;
2. Metodica ISO 9308-1 del 2014 con la metodica APAT-CNR-IRSA 7010C relativa alla ricerca di batteri coliformi totali.

- Il lavoro si è articolato in due parti:



MATERIALI E METODI

Generalità del metodo:

Tecnica della filtrazione su membrana

- filtrazione di 100 ml di acqua attraverso una membrana
- vantaggi: 1- concentrazione dei microrganismi
2- semina più rapida sul terreno di coltura
3- analisi di volumi $>$ di campione.



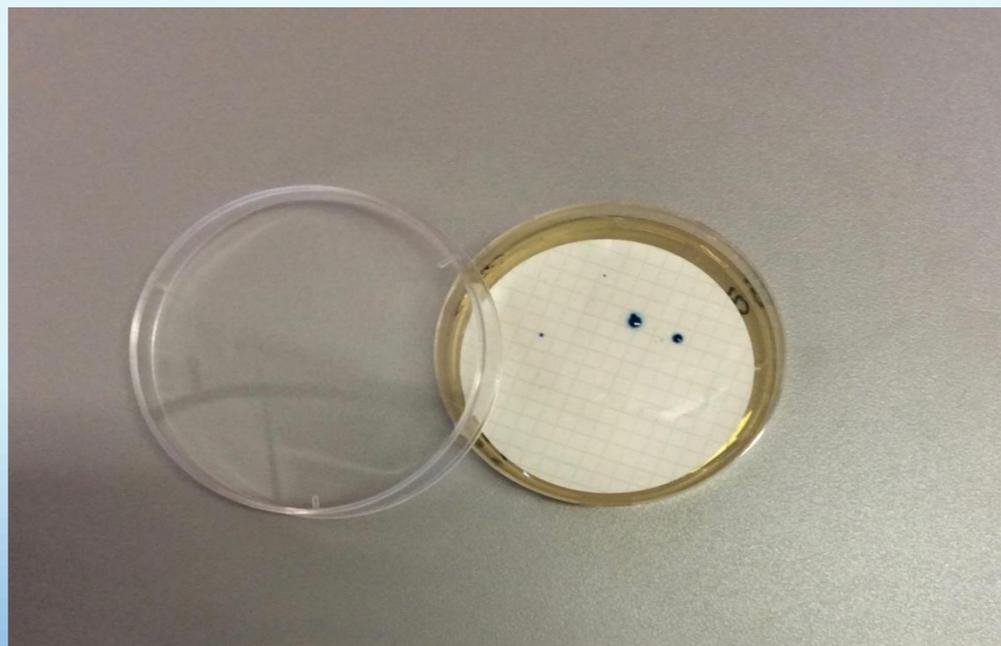
MATERIALI E METODI

Metodica APAT-CNR-IRSA 7030C

- Ricerca di *E. coli*
- Terreno cromogeno e differenziale C-EC agar.
- Incubazione per 18-24 ore a 44°C.
- Le colonie di *E. coli* si presentano verde-blu fluorescenti alla luce ultravioletta.

Metodica APAT-CNR-IRSA 7010C

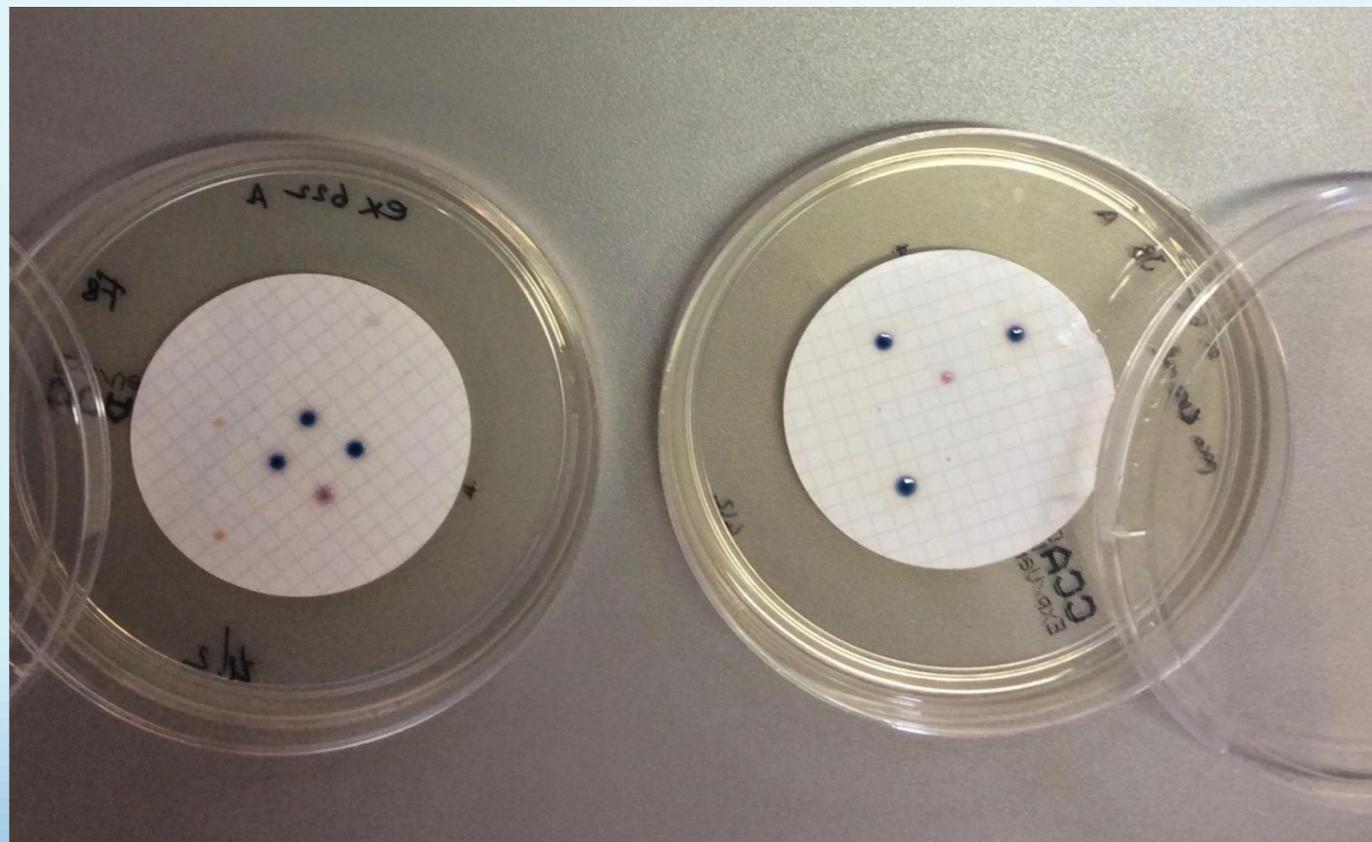
- Ricerca di batteri coliformi (incluso *E. coli*)
- Incubazione per 18-24 ore a 36°C.
- Le colonie di batteri coliformi sono verde-blu, non fluorescenti alla luce ultravioletta.



MATERIALI E METODI

Metodica ISO 9308-1 del 2014

- Ricerca sia *E. coli* che batteri coliformi totali.
- Terreno Cromogenic Coliform Agar (CCA) incubato per 24 ore a 36°C.
- Le colonie di *E. coli* risultano blu-viola, mentre le colonie di batteri coliformi (eccetto *E. coli*) si presentano di colore rosa-rosso.
- Le colonie rosa-rosso devono essere negative alla prova di conferma dell'ossidasi.



RISULTATI

Parte sperimentale A (quantitativa)

terreno	Batterio bersaglio	sensibilità	specificità	selettività	tasso falsi positivi	tasso falsi negativi
CCA ISO 9308-1 2014	<i>E. coli</i>	93,8%	97,4%	-0,78	6,2%	2,6%
CCA ISO 9308-1 2014	coliformi totali	91%	93,9%	-0,32	5,1%	10,7%
C-EC agar 7030 C	<i>E. coli</i>	97%	93%	-0,25	5%	4%
C-EC agar 7010 C	coliformi totali	92%	90%	-0,26	8%	10%

	Precisione	
terreno	u (Poisson) $\pm n\%$	u secondo ISO 13843
CCA <i>E. coli</i>	16,3%	28,3%
CCA coliformi totali	14%	48,7%
C-EC <i>E. coli</i>	19,7%	15,3%
C-EC coliformi totali	13%	15,6%

RISULTATI

Parte sperimentale B (qualitativa)

Risposta- <i>E. coli</i>	ISO 9308-1 2014	ISO 9308-1 2014	Risposta- coliformi totali	ISO 9308-1 2014	ISO 9308-1 2014
	+	-		+	-
APAT-CNR-IRSA 7030 C +	(19) +/+	(3) -/+	APAT-CNR-IRSA 7010 C +	(111) +/+	(0) -/+
APAT-CNR-IRSA 7030 C -	(0) +/-	(259) -/-	APAT-CNR-IRSA 7010 C -	(1) +/-	(169) -/-

APAT-CNR-IRSA 7030C:

Sensibilità relativa = 86%

Specificità relativa = 100%

ISO 9308-1 2014:

Sensibilità relativa = 100%

Specificità relativa = 98,9%

Esattezza relativa = 98,9%

APAT-CNR-IRSA 7010 C:

Sensibilità relativa = 100%

Specificità relativa = 99%

ISO 9308-1 2014:

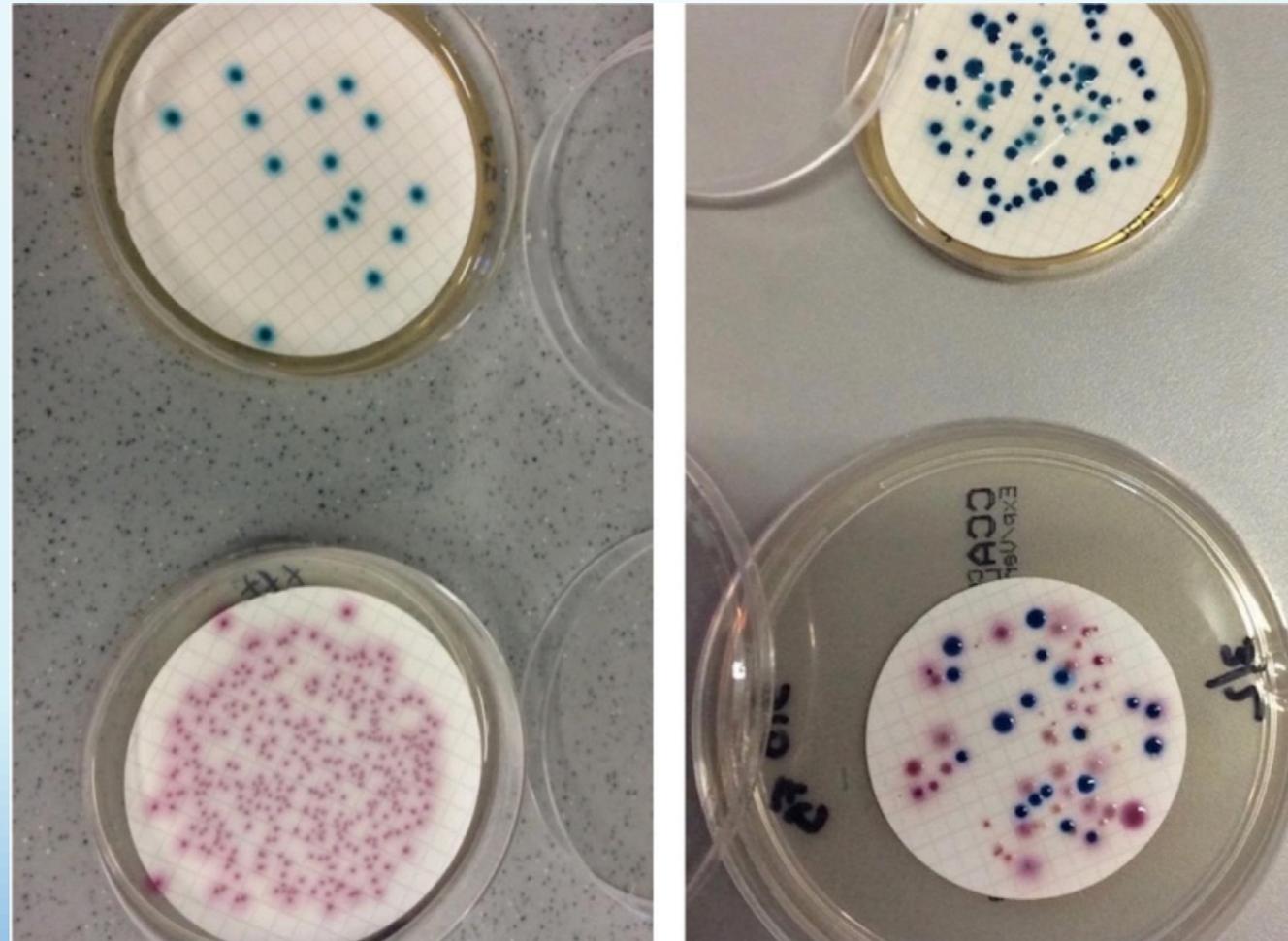
Sensibilità relativa = 99%

Specificità relativa = 100%

Esattezza relativa = 99,6%

CONCLUSIONI

- I risultati ottenuti dall'analisi statistica sono simili.
 - Tempi di risposta sovrapponibili (24 ore).
 - Ideali per campioni poco contaminati.
- Vantaggi metodo ISO del 2014: - riduzione dei costi
 - riduzione del tempo di analisi.
- La metodica ISO risulta vantaggiosa rispetto alle metodiche APAT precedenti.



GRAZIE PER L'ATTENZIONE