





**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO**

**SCUOLA DI MEDICINA DI TORINO**

**CORSO DI LAUREA IN  
TECNICHE DI LABORATORIO BIOMEDICO**

**PRESIDENTE: Prof.ssa Anna Maria CUFFINI**

**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.**

**MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF WATER:  
COMPARISON BETWEEN UNI/EN/ISO 9308-1 2014  
METHOD AND APAT-CNR-IRSA 7010C AND 7030C  
2003.**

*RELATORE*

*Dott.ssa. Sara Agata Caterina Scutera*

*CORRELATORE*

*Dott.ssa Maria Francesca Borney*

*CANDIDATO*

*Fabio Rocca*

*Anno Accademico 2014-15*

## INDICE

1	Introduzione	p-5
1.1	Scelta del lavoro	p-5
1.2	Acqua destinata al consumo umano e salute	p-5
1.3	Organismo indicatore	p-11
1.4	<i>Enterobacteriaceae</i> o enterobatteri	p-15
1.4.1	<i>Escherichia</i>	p-19
1.4.2	<i>Shigelle</i>	p-21
1.4.3	<i>Salmonelle</i>	p-23
1.4.4	<i>Klebsielle</i>	p-24
1.4.5	<i>Yersinie</i>	p-25
1.4.6	<i>Enterobacter</i>	p-26
1.4.7	<i>Serratia</i>	p-26
1.4.8	<i>Proteus</i>	p-26
1.5	Batteri coliformi	p-27
1.6	Altri microrganismi patogeni associati a contaminazione fecale	p-29
1.6.1	<i>Vibrioni</i>	p-29
1.6.2	<i>Clostridi</i>	p-29
1.6.3	<i>Pseudomonas</i>	p-31
1.6.4	<i>Rotavirus</i>	p-32
1.7	ARPA e validazione	p-33
1.8	Campionamento	p-41
1.9	Generalità del metodo	p-45
2	Scopo del lavoro	p-48
3	Materiali e metodi	p 50
3.1	Metodo APAT-CNR-IRSA 7030C Man 29 2003 per <i>Escherichia coli</i>	p-50
3.1.1	Materiali	p-50
3.1.2	Procedimento	p-51

3.1.3	Espressione dei risultati	p-52
3.2	Metodo APAT-CNR-IRSA 7010C Man 29 2003 per batteri coliformi totali	p-52
3.2.1	Materiali	p-53
3.2.2	Procedimento	p-53
3.2.3	Espressione dei risultati	p-53
3.3	Metodo ISO 9308-1 2014 per <i>E. coli</i> e batteri coliformi totali	p-53
3.3.1	Materiali	p-54
3.3.2	Procedimento	p-56
3.3.3	Espressione dei risultati	p-57
3.4	Scelta dei campioni	p-58
3.5	Analisi statistica	p-62
3.5.1	Analisi statistica sezione A	p-62
3.5.2	Analisi statistica sezione B	p-68
4	Risultati	p-70
4.1.1	Risultati parte sperimentale A	p-70
4.1.2	Elaborazione dei dati parte A	p-75
4.2.1	Risultati parte sperimentale B	p-80
4.2.2	Elaborazione dei dati parte B	p-81
5	Conclusioni	p-83
6	Bibliografia	p-88

## INTRODUZIONE

### 1.1 SCELTA DEL LAVORO

La scelta del lavoro nasce in occasione della pubblicazione della nuova norma UNI/EN ISO 9308-1 del 2014 relativa alla ricerca di *Escherichia coli* e batteri coliformi nelle acque destinate al consumo umano, che sostituisce tutte le precedenti norme ISO che trattano l'argomento. L'Arpa Valle d'Aosta non essendo ancora abilitata a operare secondo la nuova ISO dovrebbe utilizzare il metodo previsto dalla norma ISO 9308-1 precedente (risalente all'anno 2000), ma sulla base delle esigenze laboratoristiche le metodiche scelte sono la APAT-CNR-IRSA 7030C per la ricerca di *E. coli*, e la metodica APAT-CNR-IRSA 7010C per la ricerca dei batteri coliformi, metodiche che prevedono tempi di risposta molto brevi (24 ore) e facilità di analisi maggiore rispetto al metodo ISO. Dopo l'uscita della nuova norma ISO 9308-1 del 2014 anche l'ARPA Valle d'Aosta deve allinearsi e seguire la norma ISO, per questo il lavoro si prefigge lo scopo di valutare la performance del metodo previsto dalla ISO 9308-1 del 2014 rispetto al metodo APAT-CNR-IRSA 7030C relativo alla ricerca di *E. coli* e in rapporto al metodo APAT-CNR-IRSA 7010C relativo alla ricerca dei batteri coliformi.

### 1.2 ACQUA DESTINATA AL CONSUMO UMANO E SALUTE

Nell'ampio spettro di patologie umane trasmesse attraverso l'acqua alcune sono da attribuire a microrganismi autoctoni dell'ambiente acquatico, l'incidenza di queste patologie è correlata alle esposizioni umane alle naturali risorse idriche (*Legionella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio sp.*). Altre patologie che hanno come veicolo l'acqua sono dovute ad agenti patogeni derivanti dal tratto gastrointestinale degli animali a sangue caldo e dell'uomo, pervenuti nell'ambiente acquatico in seguito ad episodi di contaminazione fecale; in quest'ultimo caso, la concentrazione dei microrgani-

smi patogeni nell'ambiente dipende dal numero di persone infette e di portatori asintomatici presenti nella comunità, dall'efficacia dei sistemi di trattamento delle acque e dalla capacità di autodepurazione dei corpi idrici recettori.(1)

Il rischio infettivo è ancora molto elevato nei Paesi meno sviluppati mentre nei Paesi industrializzati, negli ultimi decenni, è stato registrato, in generale, un declino delle patologie legate alla diffusione dei più tradizionali patogeni enterici. Ciò è dovuto principalmente alla messa in opera di tecnologie adeguate per il trattamento e la disinfezione delle acque, alle campagne di vaccinazione e al ricorso all'uso degli antibiotici. Tuttavia, in Europa, sono ancora poco applicati i sistemi di sorveglianza microbiologica per l'analisi dei microrganismi responsabili di malattie trasmesse attraverso le acque potabili. Considerando che il nostro Paese è tra quelli che non hanno un sistema di raccolta di dati epidemiologici per le cosiddette "waterborne diseases", si può ben comprendere che i dati, riferibili all'area europea, costituiscono una sottostima della reale diffusione di malattie idro-trasmesse. I dati più recenti, raccolti in 17 Paesi europei, hanno registrato un totale di 2,5 milioni di casi di malattie gastrointestinali, il 2% dei quali attribuibile all'acqua potabile. (2)

Un'attenzione particolare va posta nel monitoraggio delle acque destinate al consumo umano, definito nel D. Lgs. 2 febbraio 2001, n. 31 "Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano". La legge prevede che le acque destinate al consumo umano devono essere salubri e pulite e non devono contenere microrganismi e parassiti, né altre sostanze, in quantità o concentrazioni tali da rappresentare un potenziale pericolo per la salute umana. Per garantire che le acque soddisfino i requisiti previsti, la legge stessa specifica i controlli da effettuare che si dividono in due tipi: interni ed esterni. Si definiscono controlli in-

terni i controlli effettuati dal gestore del servizio idrico integrato per la verifica della qualità dell'acqua destinata al consumo umano. Per l'effettuazione dei controlli il gestore del servizio idrico integrato si avvale di laboratori di analisi interni, ovvero stipula apposita convenzione con altri gestori di servizi idrici.

I controlli esterni sono quelli svolti dall'Azienda Unità Sanitaria Locale (AUSL) territorialmente competente, per verificare che le acque destinate al consumo umano soddisfino i requisiti del decreto, sulla base di programmi elaborati secondo i criteri generali dettati dalle regioni in ordine all'ispezione degli impianti, alla fissazione dei punti di prelievo dei campioni da analizzare, agli impianti di distribuzione domestici, e alle frequenze dei campionamenti, intesi a garantire la significativa rappresentatività della qualità delle acque distribuite durante l'anno. Per le attività di laboratorio le aziende unità sanitarie locali si avvalgono delle Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA), ai sensi dell'articolo 7-quinquies del decreto legislativo 30 dicembre 1992, n. 502. (3)

L'importanza dei controlli sul territorio è fondamentale, in quanto permette di individuare con discreta precisione il luogo di origine di una contaminazione fecale di una fonte d'acqua, per permettere una chiusura preventiva delle fonti d'acqua contaminate e proteggere i cittadini da possibili infezioni batteriche e virali associate alla contaminazione fecale. Nei paesi industrializzati questo permette di raggiungere un buon livello di sicurezza delle fonti idriche: secondo un report dell'EFSA (European Food Safety Agency) nel 2013 in Europa si contano nove casi di infezioni gravi causate da contaminazione attraverso l'acqua. (4)

Quantità, continuità e qualità sono i requisiti che devono essere garantiti per fornire acqua idonea all'uso potabile. La qualità è un concetto che si è evoluto con i criteri di valutazione del rischio correlato alla presenza di elementi naturali o dovuti a contaminazione antropica. La qualità dell'acqua è

un problema attuale e critico come quello della sua disponibilità e ha un legame diretto con la salute delle popolazioni. Il rapporto di correlazione tra acqua disponibile e salute umana è ben noto. Il problema della fornitura e dell'uso di acqua qualitativamente accettabile è stato solo parzialmente risolto, e in modo quasi soddisfacente, limitatamente al rischio infettivo, solo nei Paesi occidentali. Rimane ancora aperto il problema del rischio legato alla diffusione e alla presenza nelle acque di sostanze chimiche provenienti dai settori industriale e agricolo, e soprattutto il rischio infettivo in molti Paesi in via di sviluppo. (5) Infatti, per la maggior parte delle popolazioni in via di sviluppo, una delle più gravi minacce è rappresentata dall'utilizzo di acqua non rispondente ai requisiti di potabilità.

L'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) ha, tra gli altri compiti, quello di generare report riguardanti la percentuale di persone affette dalle malattie, e di redigere statistiche sulla quantità di popolazione che ha accesso a cure mediche o all'acqua corrente e sanificata. In particolare è possibile valutare mediante grafico (Fig, 1-1) la disponibilità di acqua controllata nei vari Paesi del mondo, utile a capire il legame tra igiene, controllo e utilizzo di acqua non sanificata è al contrario l'utilizzo di acqua sicura dal punto di vista microbiologico, chimico e fisico.



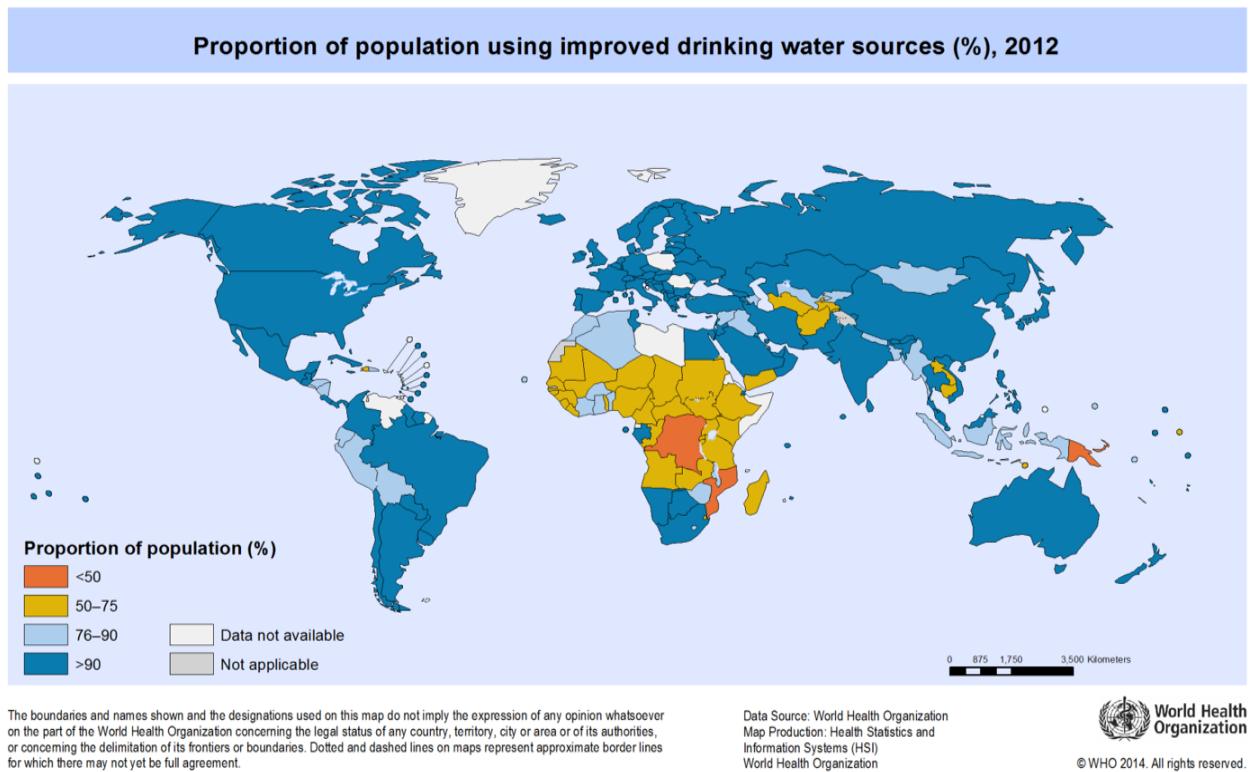


Fig 1.1: Figura che mostra la percentuale della popolazione mondiale che utilizza acqua (2012).

Le zone in blu si riferiscono a popolazioni che usano acqua controllata e sicura, le zone da giallo a arancione zone in cui più del 50% della popolazione non ha accesso a acqua sicura. (6)

Nel grafico della Fig, 1-2, sempre redatto dall’OMS, viene invece presentata la distribuzione dei casi di *Vibrio cholerae*, uno dei principali batteri patogeni trasmesso per contaminazione fecale e associato a scarsa qualità dell’acqua.

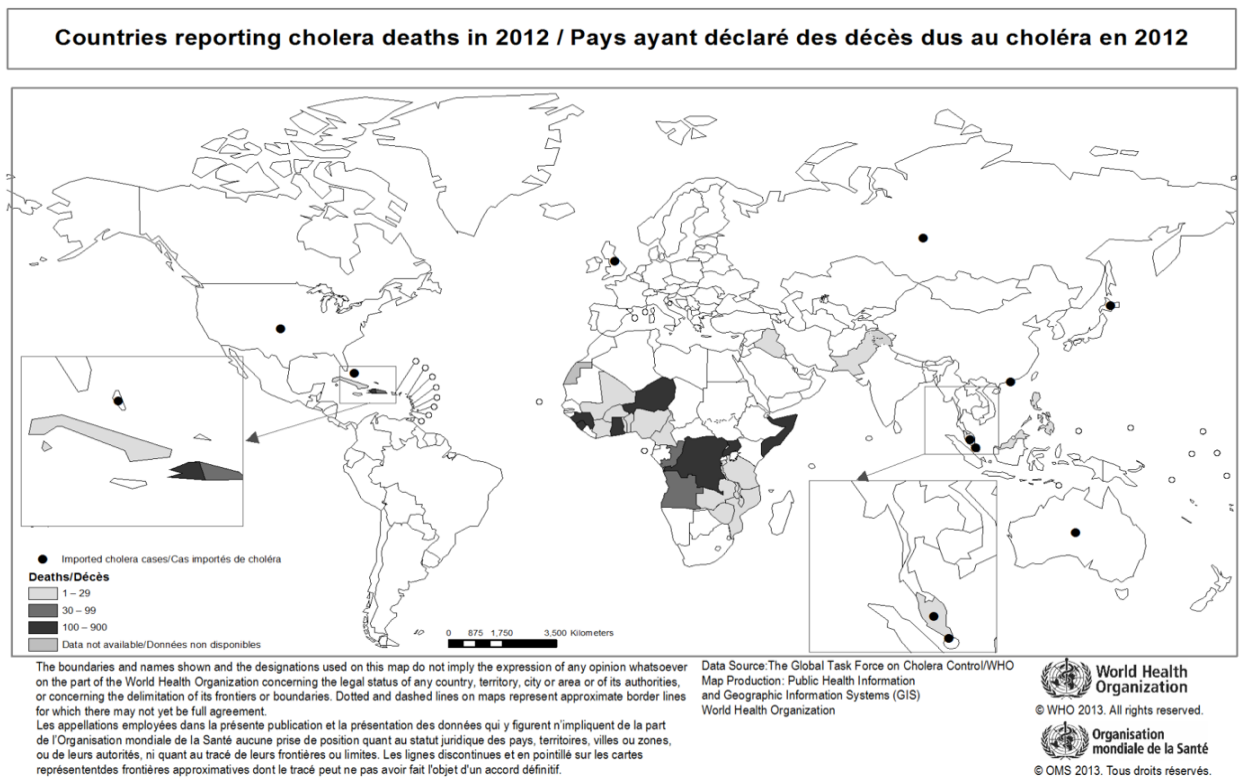


Fig 1.2: Casi di morte dovuti al colera nel 2012.

L'assenza di casi di colera è rappresentata dalle zone in bianco, le zone in cui sono stati rilevati da 30 a 99 casi di colera sono evidenziate in grigio, mentre le zone in cui sono stati rilevati da 100 a 900 casi di morte legata al colera sono in nero. I punti neri sparsi per la cartina rappresentano casi di colera importato in una zona a basso rischio. (7)

Come si deduce dai grafici riportati vi è una correlazione diretta tra utilizzo di acqua non controllata, e perciò potenzialmente inquinata, e la distribuzione dei casi di infezioni da *Vibrio cholerae*. Nelle zone in cui la percentuale di acqua sanificata è minore la percentuale di infezioni da *Vibrio cholerae* è maggiore.

### 1.3 ORGANISMO INDICATORE

In Italia, relativamente alle acque destinate al consumo umano, il DL. vo n. 31/01, recepimento della Direttiva europea 98/83/CE, prevede, nell' allegato 2, la ricerca del parametro *E. coli* in sostituzione dei coliformi fecali, mentre è ancora prevista la ricerca del parametro coliformi totali indicati col termine "batteri coliformi a 37 °C". In questa tipologia di acqua i coliformi totali, possono assolvere il ruolo di primo marcatore per ulteriori accertamenti. La loro presenza nelle reti di distribuzione può fornire indicazioni sull'efficienza dei processi di trattamento e di disinfezione e può essere un segnale dell'avvenuta rottura delle barriere sanitarie. (8) La valutazione della qualità microbiologica dell'acqua si basa quindi sulla definizione e sulla ricerca di organismi indicatori per i quali vengono fissati opportuni valori guida, definiti nella tabella seguente presente nel decreto legislativo 31/2001(Tabella 1-1). Un parametro ricercato è rappresentato dalla presenza degli Enterococchi, batteri Gram positivi che fanno parte della flora intestinale animale e dell'uomo e che vengono ricercati come indice di una contaminazione fecale pregressa, ovvero antecedente al prelievo. Il DL. vo 31/2001 stabilisce che il parametro *Cl. perfringens* (spore comprese) sia da determinare solo quando le acque derivino o siano influenzate da acque superficiali, in quanto questo batterio è presente solitamente nel terreno. (9)

<b>Parametro</b>	<b>Valore di parametro (numero/100 ml)</b>
<i>Escherichia coli</i>	0
<i>Enterococchi</i>	0
Conteggio colonie a 22°C	senza variazioni di rilievo/ml
Coliformi totali	0

Tabella 1-1: Organismi da ricercare nelle acque destinate al consumo umano.

Per le acque in vendita in bottiglie o contenitori sono applicati i valori riportati nella Tabella1-2. (10)

<b>Parametro</b>	<b>Valore di parametro (numero/250 ml)</b>
<i>Escherichia coli</i>	0
<i>Enterococchi</i>	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0
Conteggio colonie a 22°C	100/ml
Conteggio colonie a 37°C	20/ml
Coliformi totali	0

Tabella 1-2: Organismi da ricercare nelle acque in vendita in bottiglia.

Come si nota nella tabella non vengono ricercati tutti i microrganismi che potrebbero potenzialmente inquinare una fonte di acqua ma solo alcuni batteri considerati indicatori, ovvero che sono legati in maniera specifica e univoca a contaminazioni esterne.

La ricerca di *Pseudomonas aeruginosa* nelle acque destinate al consumo umano ha una rilevanza legata prevalentemente alla verifica dell'efficacia del trattamento a cui sono soggette le acque ovvero ai processi di potabilizzazione. (11)

Vi sono inoltre altri parametri specifici che possono essere ricercati a giudizio dell'autorità competente che permettono di dare un quadro più completo all'analisi microbiologica dell'acqua:

- 1) alghe;
- 2) batteriofagi anti *E. coli*;
- 3) elminti;
- 4) enterobatteri patogeni;
- 5) enterovirus;
- 6) funghi;
- 7) protozoi;
- 8) stafilococchi patogeni.

Tali parametri devono comunque essere costantemente assenti nelle acque destinate al consumo umano. (12)

Un organismo per essere considerato un indicatore deve soddisfare i seguenti requisiti:

- deve essere presente nell'acqua tutte le volte in cui sono presenti i microrganismi patogeni;
- la sua concentrazione nell'acqua deve essere in relazione a quella dei microrganismi patogeni e comunque deve riflettere il livello di inquinamento microbiologico;

- la sua sopravvivenza nell'acqua deve essere simile a quella dei microrganismi patogeni;
- la resistenza nei confronti dei trattamenti di depurazione e di disinfezione deve essere simile a quella dei microrganismi patogeni;
- non deve essere patogeno;
- il suo ruolo di indicatore deve essere valido in qualsiasi tipologia di acqua che richieda un programma di monitoraggio;
- le sue caratteristiche non devono mutare nel tempo;
- non deve essere in grado di moltiplicarsi o crescere nell'acqua;
- deve essere rilevabile con metodi semplici, accurati, rapidi ed economici.

Il ricorso all'uso di organismi indicatori non consente una stima diretta della presenza di un dato microrganismo patogeno nell'ambiente idrico; permette, piuttosto, la valutazione della probabilità che esso sia presente.

(13) Nessuno degli indicatori può dare la sicurezza dell'assenza anche di patogeni primari o potenziali, specialmente di quelle forme dotate di alto potere infettante ed elevata resistenza alle condizioni ambientali e alla disinfezione (cisti di protozoi, virus enterici). Infatti, non esiste un indicatore capace di segnalare tutti i patogeni, anche nel circoscritto ambito dell'inquinamento fecale.

La ricerca degli indicatori, rispetto a quella diretta dei singoli microrganismi patogeni, ha il vantaggio di essere indipendente dall'andamento endemico di alcune infezioni microbiche. I dati desunti dalla ricerca diretta dei patogeni non hanno un valore predittivo poiché sono legati a diversi fattori, primo fra tutti la diffusione delle patologie nella popolazione, e potrebbero condurre a conclusioni poco attendibili. (14)

## 1.4 ENTEROBACTERIACEAE O ENTEROBATTERI

Il gruppo di batteri oggetto di studio è rappresentato dai coliformi, con particolare interesse per *Escherichia coli*. I batteri coliformi e *E. coli* sono inclusi nella famiglia delle Enterobacteriaceae che comprende un gran numero di batteri che si localizzano nel tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo. Gli enterobatteri raggruppano diversi generi e specie accomunati da caratteristiche biochimiche e antigeniche simili. Di seguito è riportato uno schema che racchiude i principali generi appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae. (Fig 1-3)

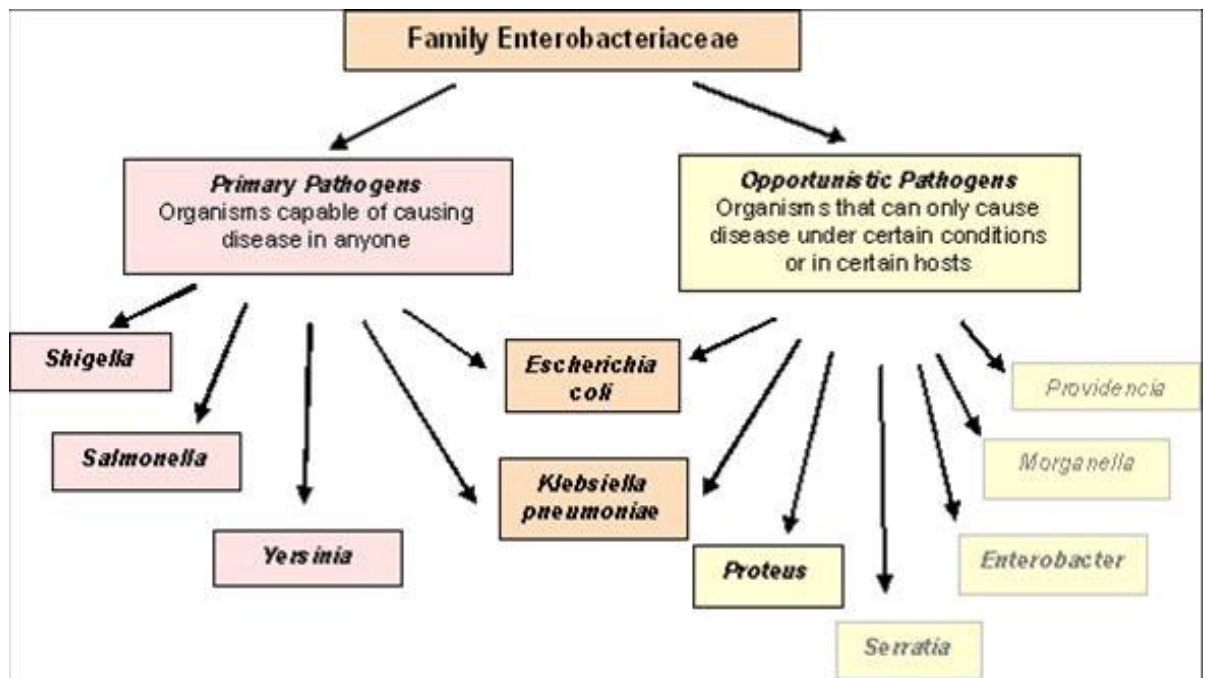


Fig 1-3: Famiglia delle Enterobacteriaceae

Le Enterobacteriaceae o enterobatteri sono batteri Gram negativi, di forma solitamente bacillare e asporigeni; possono essere mobili con flagelli peritrichi o immobili. Gli enterobatteri si presentano come aerobi-anaerobi facoltativi;

- ─ coltivati in aerobiosi producono citocromi e ricavano energia dalla completa ossidazione dell'acido piruvico attraverso il ciclo di Krebs

(eccetto *Erwinia* e *Yersinia*, che sono in grado di utilizzare i nitrati come accettori inorganici di idrogeno nella respirazione anaerobia);

- coltivati in anaerobiosi sono in grado di utilizzare il glucosio per via fermentativa con produzione di acidi e di gas.

Tutti crescono bene nei comuni terreni di coltura; per quanto riguarda alcuni generi (*Escherichia*, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Salmonella*) lo sviluppo in terreni di coltura è inibito dalla presenza di piccole concentrazioni di cianuro di potassio. I generi *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* sono lattosio fermentanti mentre i generi *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* sono lattosio non fermentanti. L'aspetto delle colonie è simile per tutte le specie e non costituisce un carattere utile per l'identificazione, fatta eccezione per il genere *Proteus*, le cui colonie in terreni solidi tendono ad invadere tutta la superficie disponibile (colonie sciamanti) per la notevole mobilità dei batteri.

La loro identificazione è possibile in base a una serie di caratteri biochimici:

1. capacità di utilizzare alcuni substrati come fonte di carbonio;
2. presenza di particolari enzimi;
3. produzione di specifici prodotti metabolici;
4. capacità di fermentare particolari zuccheri;

I caratteri antigenici comuni ai batteri coliformi sono:

La superficie della parete presenta numerose molecole di LPS (endotossina). La componente lipopolisaccaridica della membrana esterna è responsabile sia delle proprietà tossiche dei batteri (endotossina) dovute alla sua porzione lipidica, sia della proprietà antigenica indicata come antigene O, la cui specificità è conseguente alla composizione e alla disposizione della porzione polisaccaridica.



La composizione del lipide O è estremamente complessa, formato da due porzioni di cui una, costituita da una sorta di scheletro comune, identica in tutti gli enterobatteri. A questa porzione comune sono attaccate differenti e specifiche catene saccaridiche, che rappresentano i determinanti antigenici specifici. La porzione basale comune viene anche denominata antigene R. Le catene specifiche, che possono essere di vario tipo, condizionano la specificità sierologica dell'antigene O, ne possono esistere più tipi nello stesso batterio e, contemporaneamente, una stessa catena può essere presente in più batteri diversi.

Situato più superficialmente rispetto all'antigene O è presente in molti enterobatteri un involucro di polisaccaridi acidi che ne rappresenta lo strato mucoso. Esso è denominato antigene K, in tutti gli enterobatteri, con l'eccezione delle salmonelle dove è indicato come antigene Vi.

L'antigene K è costantemente presente in una notevole varietà enterobatteri del gruppo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* che sono costantemente provvisti di una capsula ben sviluppata; nei batteri del gruppo *Escherichia* gli antigeni K comprendono sia antigeni di natura polisaccaridica dello strato mucoso, sia antigeni proteici presenti nelle fimbrie o pili che rappresentano gli strumenti per l'adesione specifica del batterio a particolari superfici mucose; nelle salmonelle che lo producono, l'antigene Vi è presente solo occasionalmente. *Citrobacter*, *Edwardsiella* e *Proteus*, non possiedono antigeni K. Mentre i *Providencia* possiedono antigeni K con una notevole varietà di tipi antigenici. Negli enterobatteri mobili, è presente una terza categoria di antigeni rappresentati dalle proteine flagellari, antigeni H, i quali possono presentare una grande varietà di differenti specificità antigeniche. Gli enterobatteri sono coinvolti in una serie di manifestazioni morbose che colpiscono l'uomo:

1. Infezioni sistemiche; rappresentate dalle febbri enteriche (tifo e paratifo) in cui l'interessamento dell'intestino si accompagna a una diffusione

dell'infezione a tutto l'organismo (via ematica e/o linfatica) con localizzazioni extra intestinali (epatiche).

2. Infezioni esclusivamente intestinali; sono rappresentate da varie forme di gastriti e gastroenteriti, causate da batteri dei generi *Salmonella* e *Shigella* e da alcuni stipiti di *Escherichia coli*. Le enteriti da enterobatteri fanno parte di una vasta gamma di sindromi morbose caratterizzate da sintomi diarroici (diarrea = anomala ed elevata frequenza e liquidità delle emissioni di materiale fecale) e/o dissenterici (la dissenteria è un processo infiammatorio della mucosa del colon, accompagnato da dolori addominali ed emissione di muco o di sangue nelle feci).

Dal punto di vista del meccanismo di azione patogena gli enterobatteri enteropatogeni si distinguono in:

- **invasivi**; rappresentati da *Shigelle*, *Salmonelle*, ed alcuni tipi di *E. coli*. Essi si localizzano nella porzione distale dell'intestino penetrando nella mucosa dove provocano alterazioni istopatologiche evidenti. I sintomi clinici di queste enteriti sono di tipo dissenterico per le alterazioni infiammatorie della mucosa della porzione distale dell'intestino, con una variabile proporzione di sintomi diarroici a causa dell'aumentata secrezione digiunale che si sovrappone alla diminuita capacità di assorbimento dei liquidi nella porzione distale. Gli enterobatteri invasivi non producono enterotossine.
- **Non invasivi**; rappresentati da alcuni stipiti di *E. coli*. Essi si localizzano nell'intestino tenue (ileo) ed elaborano enterotossine che agiscono stimolando l'attività secretoria della mucosa intestinale, senza provarvi lesioni. I difetti di trasporto (eccesso di secrezioni di liquidi) sono limitati all'intestino tenue e

la sintomatologia è di tipo diarroico ed è conseguente al superamento della capacità di assorbimento di liquidi da parte del colon.

3. Infezioni a localizzazione extra intestinale; sono rappresentate da infezioni urinarie (cistiti, pieliti) nella maggior parte dei casi sostenute da *E. coli*. Queste infezioni sono nella maggior parte dei casi infezioni endogene e fanno seguito alla diffusione in altre sedi dell'organismo (ad esempio la vescica urinaria) di enterobatteri commensali intestinali.

Il meccanismo d'azione patogena è complesso, intervengono:

- l'attività anti-fagocitaria delle strutture di superficie (polisaccaride dello strato mucoso o della capsula);
- l'adesività legata alla presenza di fimbrie specifiche;
- tossicità dell'endotossina, di cui è responsabile la porzione lipidica dell'LPS.
- elaborazione di tossine proteiche (in alcuni casi). (15)

### **1.4.1 ESCHERICHIA**

Il genere *Escherichia* comprende un'unica specie, definita *Escherichia coli*. Si tratta di un bacillo presente nel colon di animali e uomo, definito commensale e considerato la specie numericamente predominante della flora microbica intestinale. Il batterio ha la capacità di fermentare il lattosio e dal punto di vista sierologico presenta differenti sierotipi sulla base dei diversi antigeni presenti (antigene O, K, e H).

Questo genere causa differenti patologie a seconda del sierotipo implicato e del numero di batteri infettanti:

1. Infezioni delle vie urinarie (endogene); sostenute da sierotipi provvisti di fimbrie (pili), codificate da uno specifico gene denominato PAP.
2. Infezioni intestinali(esogene); i batteri responsabili sono:

- a) batteri EPEC (*E. coli* enteropatogeni) e ETEC (*E. coli* enterotossigeni) che si localizzano a livello dell'intestino tenue e provocano la comparsa di enteriti diarroiche per azione diretta (distruzione dei microvilli) sugli epitelii mucosi (stipiti EPEC) o per la produzione di enterotossine (stipiti ETEC);
- b) sierotipi EIEC (*E. coli* entero-invasivi) e EHEC (*E. coli* enteroemorragici) che si localizzano a livello dell'intestino crasso e provocano la comparsa di enteriti dissenteriche a seguito dei fenomeni infiammatori conseguenti all'invasione della mucosa (stipiti EIEC). Le infezioni da EHEC, possono essere complicate da colite emorragica e sindrome uremica emolitica. I sierotipi EHEC elaborano, per un fenomeno di conversione lisogenica, due citotossine: una Verotossina 1 (Shiga-like 1) è apparentemente identica alla tossina di *Shigella dysenteriae* 1 (tossina di Shiga) e viene neutralizzata da anticorpi specifici; la seconda chiamata Verotossina 2 o (Shiga-like 2) è invece antigenicamente differente. Questi sierotipi sono sprovvisti di potere invasivo e provocano quadri enteritici con scarsi sintomi dissenterici clinicamente meno gravi di quelli provocati da *Shigella*. Le tossine di Shiga e Shiga-like, diffondendo attraverso la mucosa, raggiungono il circolo ematico e si legano, attraverso recettori glicolipidici di superficie, alle cellule vascolari endoteliali che ne risultano danneggiate. Il danneggiamento delle cellule si accompagna alla liberazione di varie citochine le quali inducono fenomeni coagulativo-emorragici che possono interessare direttamente il colon (colite emorragica). La complicanza più grave è rappresentata dalla sindrome uremico emolitica causata da insufficienza renale acuta, anemia emolitica microangiopatica, trombocitopenia.

3. Meningite neonatale; *E. coli* è il più frequente agente di meningite neonatale (da infezione esogena intra partum), il 75% dei ceppi responsabili possiede l'antigene capsulare K1.

La diagnosi relativa alle infezioni causate dal genere *Escherichia* si basa su diversi tipi di prove:

1- coltivazione del batterio a partire dalla fonte da cui si sospetta provenga l'infezione. Il batterio cresce nella maggior parte dei terreni non differenziali;

2- prove biochimiche che comprendono la valutazione dell'adesività batterica, mediante lo studio della capacità emoagglutinante del batterio per particolari tipi di emazie o della capacità del batterio di aderire alla superficie di cellule coltivate in vitro, e la ricerca della produzione di enterotossine mediante prove immunologiche (tecniche immuno-enzimatiche);

3- la ricerca della produzione di Vero- tossine (Shiga-like) mediante la dimostrazione di azione citotossica nei confronti di linee cellulari coltivate *in vitro*;

4- valutazione del potere invasivo, mediante la dimostrazione della capacità di penetrare all'interno di cellule coltivate *in vitro*. (16)

### 1.4.2 SHIGELLE

Sono distinte in quattro sottogruppi, ognuna delle quali comprende diversi sierotipi.

Sottogruppo A: *Shigella dysenteriae*

Sottogruppo B: *Shigella flexneri*

Sottogruppo C: *Shigella boydii*

Sottogruppo D: *Shigella sonnei*

Questo genere batterico è solitamente immobile e lattosio non fermentante.

Le *Shigelle* sono gli agenti eziologici della dissenteria bacillare, malattia con breve periodo di incubazione (3-6 giorni) e caratterizzata da una sintomatologia con violente scariche diarroiche muco-sanguinolente. Alla diarrea si associano febbre lieve, dolori addominali, tenesmo e vomito, insieme a segni di compromissione generale. La malattia si contrae per ingestione di alimenti contaminati da feci di malati o di portatori sani (convalescenti). Le *Shigelle* sono parassiti esclusivi dell'uomo che rappresenta perciò l'unica sorgente di infezione. Le mosche sembrano favorire la disseminazione meccanica dell'infezione.

I batteri introdotti con gli alimenti riescono a superare la barriera dell'acidità gastrica, e vanno a localizzarsi nella mucosa del colon dove, moltiplicandosi, esercitano la loro azione patogena.

L'azione patogena è dovuta alla loro capacità di penetrare nelle cellule dell'endotelio mucoso integro, passando poi nella lamina propria della mucosa intestinale dove si moltiplicano con accumulo di prodotti metabolici e liberazione di endotossina (in seguito alla lisi dei corpi bacillari).

Nelle forme di dissenteria sostenute da *Shigella dysenteriae* di tipo 1 la patologia è sostenuta dalla produzione di una potente tossina citotossica (tossina Shiga).

La diagnosi eziologica si basa sulla coltura batterica e sulle prove di patogenicità che consistono nella dimostrazione della capacità delle *Shigelle* di penetrare all'interno di cellule *in vitro* o nella loro capacità di causare cherato-congiuntivite in cavie. (17)

### 1.4.3 SALMONELLE

Le *Salmonelle* sono responsabili di diffuse ed ubiquitarie patologie rappresentate da:

- gastroenteriti (modesta gravità)
- forme sistemiche (decorso con gravità maggiore)

Il genere *Salmonella* comprende numerosi enterobatteri differenziati sulla base dei diversi caratteri antigenici somatici (antigene O), capsulari (antigene Vi) e flagellari (antigene H).

I principali quadri patologici di cui sono responsabili le salmonelle sono rappresentati da:

1. Gastroenteriti; manifestazioni morbose che si osservano con maggior frequenza, con tendenza alla guarigione spontanea, e che sono causate da ceppi ubiquitari ampiamente diffusi in animali da allevamento (salmonellosi “minori”). Fanno seguito, dopo un breve periodo di incubazione (limitato a poche ore), all’ingestione di cibi contaminati.
2. Salmonellosi sistemiche; (tifo e paratifo) causate da ceppi esclusivi dell’uomo (*Salmonella typhi*, *S. paratyphi* A, B e C). Si trasmettono direttamente da uomo a uomo senza ospiti intermedi attraverso la via oro-fecale.

#### -*Salmonella typhi*

L’azione patogena delle *Salmonelle* avviene quando i cibi infetti raggiungono l’intestino e alcune riescono, penetrando attraverso la mucosa, a raggiungere i linfonodi mesenterici; da qui attraverso il dotto toracico si riversano nel circolo ematico provocando una fugace batteriemia, localizzandosi nelle cellule reticolo-endoteliali della milza e del fegato, nel cui interno riescono a moltiplicarsi attivamente.

Dopo il periodo di incubazione le *Salmonelle*, raggiunta una notevole consistenza numerica, passano nel sangue, provocando una batteriemia persistente per alcuni giorni (coincide con l’inizio della sintomatologia morbosa

e del rialzo termico). La batteriemia è seguita da una localizzazione massiccia a livello di vari organi, e in particolare della colecisti, da dove attraverso la bile, riesce ad infiltrarsi nell'epitelio intestinale fino a raggiungere la lamina propria dove i batteri si moltiplicano. Contemporaneamente la mucosa intestinale viene colonizzata dalle *Salmonelle* anche a livello delle placche di Peyer dove per l'intensa reazione infiammatoria si producono delle ulcerazioni ricoperte da escare, il cui distacco precoce è la causa delle emorragie intestinali e delle possibili perforazioni.

- *Salmonella typhimurium*

Questo batterio contamina cibi, soprattutto uova, e causa gastroenteriti alimentari. Le gastroenteriti rappresentano la manifestazione clinica più diffusa dell'infezione da specie ubiquitarie di Salmonella. Sono caratterizzate da un'insorgenza acuta con dolore addominale, diarrea, nausea, vomito. Può presentarsi in forma epidemica in collettività che accedono allo stesso alimento; per questo motivo le salmonellosi acute sono classificate tra le intossicazioni alimentari di origine microbica come il botulismo e l'intossicazione da enterotossina stafilococcica. Le gastroenteriti da Salmonella possono diffondere anche per contagio interumano (collettività infantile, infezioni nosocomiali) e la loro diffusione è favorita dalla presenza di portatori sani. Le infezioni da salmonelle sono appannaggio della collettività in condizioni socio-economiche basse. (18)

#### **1.4.4 KLEBSIELLE**

Batteri solitamente capsulati e immobili, sono agenti infettivi di forme morbose legate principalmente all'apparato respiratorio. Di questo genere il membro isolato più frequentemente è rappresentato da *Klebsiella pneumoniae*, frequente commensale delle prime vie respiratorie; può causare varie



affezioni respiratorie (polmoniti) in soggetti debilitati per altre malattie respiratorie infettive. Oltre a malattie dell'apparato respiratorio può essere causa di infezioni dell'apparato urinario e di ferite dei tessuti molli. (19)

#### **1.4.5 YERSINIE**

Il genere *Yersinia* comprende batteri patogeni per varie specie animali che possono occasionalmente trasmettersi all'uomo (zoonosi). Sono batteri mobili di solito per presenza di flagelli peritrichi. Esistono tre specie di interesse medico:

*Yersinia pestis*

*Yersinia pseudotuberculosis*

*Yersinia enterocolitica*

*Y. Pseudotuberculosis* è un batterio bacillare, mobile, in grado di fermentare zuccheri. Agente eziologico di infezioni caratterizzate da lesioni granulomatose e micro ascessuali diffuse in varie specie animali, occasionalmente trasmissibile all'uomo nel quale può causare infezioni setticemie generalizzate molto gravi in soggetti immunodepressi.

L'infezione si contrae per contatto diretto con animali infetti, roditori domestici, criceti, cavie, gatti o per ingestione di alimenti contaminati dagli escrementi di animali infetti.

La diagnosi si basa sull'isolamento del batterio dall'organismo infetto (isolamento colturale dalle feci) e sulla ricerca di anticorpi sierici mediante prove di agglutinazione.

*Y. enterocolitica* è invece una specie di forma cocco-bacillare, immobile a 37° C e mobile e sciamante a 22° C. Nell'uomo la patologia comprende manifestazioni identiche a quelle sostenute da *Y. pseudotuberculosis* (setticemia in soggetti immunodepressi, adenite mesenterica, eritema nodoso).

L'infezione si contrae per ingestione di alimenti contaminati e i soggetti in-

fetti senza manifestazioni cliniche (portatori sani) giocano un ruolo essenziale nella diffusione. La diagnosi si basa sull'isolamento del batterio dall'organismo infetto. (20)

#### **1.4.6 ENTEROBACTER**

Batteri mobili e capsulati, fermentano il citrato e il lattosio e possono provocare infezioni opportunistiche in sedi extra intestinali soprattutto in ospiti immunodepressi. Sono presenti normalmente negli intestini degli animali e di solito non sopravvivono a lungo nell'ambiente esterno. (21)

Sono note due specie:

*Eenterobacter cloacae*

*Eenterobacter aerogenes*.

#### **1.4.7 SERRATIA**

I batteri di questo gruppo si ritrovano più frequentemente negli strati superficiali del suolo e sono saprofiti. Le colonie sono mucose e producono un pigmento rosso vivo, simulando l'aspetto di goccioline di sangue coagulato. I batteri del gruppo *Serratia* sono divisi in sei specie ma solo tre sono state isolate nell'uomo:

- *Serratia marcescens*, tipico patogeno opportunista, è stato isolato da numerose infezioni in sede extra intestinale associato ad altri patogeni. (22)
- *Serratia liquefaciens*
- *Serratia rubidae*

#### **1.4.8 PROTEUS**

Si ritrova negli strati superficiali del suolo e come componente della popolazione batterica intestinale dell'uomo. Rappresenta il più frequente agente eziologico di infezioni urinarie dopo *Escherichia*. La produzione di ureasi e

la conseguente alcalinizzazione dell'urina per la produzione di ammoniaca contribuiscono alla severità dell'infezione per il danneggiamento dell'epitelio renale e la possibile formazione di calcoli (precipitazione di sali di calcio e magnesio). Oltre a infezioni urinarie possono provocare infezioni delle vie respiratorie, e infezioni in varie sedi extra intestinali (infezioni nosocomiali). (23)

### **1.5 BATTERI COLIFORMI**

I coliformi, inclusi nella famiglia delle *Enterobacteriaceae*, sono batteri a forma di bastoncello, Gram negativi, aerobi ed anaerobi facoltativi, non sporigeni. Poiché presenti nel materiale fecale di origine umana con una densità media di  $10^9$  organismi/g, sono stati considerati, per decenni, insieme agli Streptococchi fecali, indicatori di contaminazione delle acque. Tuttavia, è ormai noto che nel gruppo sono comprese specie ambientali, in grado di colonizzare acqua, suolo e vegetazione. L'ampia diffusione nell'ambiente dei microrganismi appartenenti al gruppo ne ha quindi ridimensionato il ruolo e il significato nelle acque e contrasta nettamente con i requisiti specifici richiesti ad un indicatore di contaminazione fecale. Gli studi più recenti distinguono i microrganismi in due principali categorie che, in base alla specie, e non più al genere, differenziano i coliformi di origine fecale da quelli di origine acquatica e tellurica, naturalmente presenti nelle acque al di là di qualsiasi contaminazione.

L'appartenenza al gruppo dei coliformi, più che sulle caratteristiche sistematiche dei diversi microrganismi, si è basata storicamente sul metodo utilizzato per il loro rilevamento che sfrutta la capacità di fermentare il lattosio con produzione di gas e acido alla temperatura di 35/37°C in 48 ore. Tuttavia negli ultimi anni si è andata confermando la nozione che, tra i coliformi presenti nelle acque, una percentuale relativamente elevata non sia

in grado né di fermentare il lattosio, né di produrre gas nei tradizionali terreni di coltura e, soprattutto, che i test più classici, come l'IMVIC (Indolo, Rosso Metile, Voges Proskauer, Citrato), non hanno nessun valore discriminante per l'identificazione di *Klebsiella pneumoniae*, di *Enterobacter cloacae* e delle molte specie ambientali. Diversamente, si è consolidata l'evidenza che un'alta percentuale, intorno al 99%, possieda l'enzima  $\beta$ -D-galattosidasi. La flora più studiata, quella fecale, rappresenta il bilancio delle fermentazioni cecali e delle putrefazioni coliche associate alla disidratazione. Sebbene questa flora sia stata oggetto di una moltitudine di lavori, nessuno di questi fa riferimento ad enterobatteri diversi da *Escherichia coli*. In effetti, la predominanza di *E. coli* rispetto agli altri enterobatteri è tale da impedire, nella maggior parte dei casi, il loro isolamento e quindi il loro riconoscimento. Di seguito è riportata una tabella che presenta le specie di enterobatteri coliformi principali:

<b>Enterobatteri coliformi (classificazione tradizionale)</b>
<i>Escherichia coli</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>
<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Citrobacter diversus</i>
<i>Citrobacter amalonaticus</i>

I batteri coliformi possono diventare patogeni quando vengono a trovarsi all'esterno dell'apparato intestinale e per questo è molto pericolosa la contaminazione oro-fecale. In particolare possono essere pericolosi nei neonati e nei soggetti immunodepressi, in quanto possono raggiungere il circolo ematico e causare sepsi. (24)

## **1.6 ALTRI MICRORGANISMI PATOGENI ASSOCIATI A CONTAMINAZIONE FECALE**

Vi sono altri microrganismi patogeni che vengono trasportati dall'acqua contaminata con feci e che sono in associazione con i batteri coliformi. Questi sono rappresentati da virus enterici, e batteri quali Clostridi e Vibrioni, in grado di causare gravi patologie nell'uomo.

### **1.6.1 VIBRIONI**

Batteri Gram negativi, con forma a virgola o a C, asporigeni, mobili, non capsulati, aerobi-anaerobi facoltativi. Crescono bene nei comuni terreni di coltura, prediligendo quelli a pH alcalino. Fermentano alcuni zuccheri con produzione di acidi (non di gas), producono indolo. La maggior parte sono saprofiti, si trovano negli strati superficiali del suolo o come parassiti commensali di alcuni animali. I vibrioni che causano patologie nell'uomo sono rappresentati dalle specie:

- *Vibrio cholerae*, causante il colera
- *Vibrio parahaemolyticus*, agente eziologico di forme diarroiche conseguenti all'ingestione di molluschi o crostacei consumati crudi. (25)

### **1.6.2 CLOSTRIDI**

I Clostridi sono batteri anaerobi o microaerofili, Gram positivi a forma di bastoncino, ma spesso pleiomorfi, che formano spore. Alcuni sono capsulati e di solito sono mobili. I clostridi possono fermentare diversi zuccheri e

molti possono digerire le proteine. Il loro habitat naturale è il suolo oppure gli intestini degli animali e dell'uomo. La maggior parte delle specie è rappresentata da saprofiti che vivono nel terreno e vengono ricercati nelle acque proprio perché indice di contaminazione da un terreno o per verificare il buon trattamento dell'acqua.

I principali patogeni sono rappresentati da:

- *Clostridium botulinum*, responsabile di botulismo.

Sono tre le principali forme di botulismo:

- alimentare, dovuto alla presenza della tossina nei cibi
- da ferita o lesione, dovuto all'infezione di ferite da parte del batterio.

Ogni caso identificato di botulismo, costituisce una emergenza di salute pubblica e un problema di sicurezza alimentare: esiste, infatti, il rischio concreto che il cibo contaminato, sia di preparazione domestica che industriale, possa venire consumato da molte persone. È necessario, quindi, ritirarlo immediatamente dal mercato o dalle dispense.

Il botulismo alimentare può colpire individui di tutte le età e non è trasmissibile da persona a persona. I sintomi solitamente si manifestano rapidamente, da poche ore a pochi giorni dall'ingestione della tossina.

È possibile operare in forma preventiva, soprattutto nella produzione di conserve domestiche, facendo assoluta attenzione alle norme igieniche per evitare la presenza del batterio nelle varie fasi di preparazione e conservazione. La tossina botulinica viene distrutta alle alte temperature e, quindi, la sterilizzazione dei cibi in vasetto e in scatola, tramite bollitura per almeno 10 minuti, ne garantisce l'eliminazione.

- *Clostridium perfringens*, responsabile nell'uomo e negli animali della comparsa di numerose malattie (batteriemie, infezioni polmonari, della cute e dei tessuti molli) fra le quali è inclusa una forma gastroenterica a trasmissione alimentare. L'uomo viene a contatto con il microrganismo per mezzo

delle spore presenti nel suolo o più frequentemente, tramite alimenti contaminati. La tossinfezione alimentare è la sindrome più frequente. L'infezione si manifesta in seguito all'ingestione di cibo fortemente contaminato dall'enterotossina (CPE) e/o dalle forme vegetative del microrganismo. La mortalità è rara. I soggetti malati presentano diarrea di tipo acquoso, febbre e dolori addominali, nausea e vomito. (26)

- *Clostridium tetani*

- *Clostridium difficile*

### 1.6.3 PSEUDOMONAS

Genere di Proteobatteri della famiglia delle *Pseudomonadaceae*, con molte specie, di cui circa 90 patogene. La specie di maggiore interesse medico è *Pseudomonas aeruginosa*.

*Pseudomonas aeruginosa* è un batterio ubiquitario, presente anche sulla cute e nel tubo digerente umano. Aerobio facoltativo, di forma bastoncellare con estremità tondeggianti, estremamente mobile, Gram negativo, talvolta capsulato o dotato di mucosa pericellulare. Cresce su vari terreni batteriologici tra i 5-42° C con optimum tra 30-37°C, formando colonie tonde e lisce con caratteristico odore d'uva. Spesso in condizioni di aerobiosi produce un pigmento blu, la piocianina, che oltre a possedere una certa azione antibiotica nei confronti di altri batteri, quali *Staphylococcus aureus* o *Escherichia coli*, esercita un ruolo nella patogenesi del batterio per un'evidente azione ciliostatica a livello polmonare. Numerosi ceppi di *P. aeruginosa* producono pigmenti: la pioverdina fluorescente, che conferisce all'agar un colore verdastro, la piorubina (pigmento rosso scuro) e la piemelanina (pigmento nero).

Il batterio è spesso presente in ambienti umidi ospedalieri, dove può essere responsabile di infezioni nosocomiali particolarmente gravi in pazienti im-

munocompromessi o debilitati; il batterio, che causa infezioni, caratterizzate da un essudato bluastro, si instaura spesso in zone caratterizzate da ristagno di fluidi (tracheotomie, cateteri, ustioni, orecchio esterno e ferite cutanee esposte). Questo microrganismo rappresenta inoltre la causa principale delle complicanze infettive e della relativa elevata mortalità negli individui affetti da fibrosi cistica.

Il problema principale legato a questo batterio è la sua scarsa sensibilità innata agli antibiotici, a cui si aggiunge quella acquisita e trasmissibile ad opera di particolari fattori di resistenza agli antibiotici che risulta anche trasmissibile ad altri batteri. (27)

#### **1.6.4 ROTAVIRUS**

I *rotavirus* fanno parte della famiglia dei *Reoviridae*. I membri di questa famiglia sono sprovvisti di pericapside e caratterizzati dalla presenza di due involucri capsidici contenenti 10-12 segmenti di RNA genomico a doppio filamento. Presentano una simmetria icosaedrica e il genoma risulta segmentato e a doppio filamento. L'aspetto del virione al microscopio elettronico è a forma di ruota, da cui il nome latino "rota". Esistono sei diversi sierotipi di *rotavirus*, ma l'infezione è pericolosa solo quando provocata dai *rotavirus* A (e in misura minore da quelli B e C). La contrazione del virus non dà garanzia di immunità, anche se le infezioni che si contraggono negli anni successivi e in età adulta tendono a presentarsi in forma più leggera. Nei Paesi occidentali, la gastroenterite da *rotavirus* non è una malattia letale, ma può dare complicanze anche molto gravi nelle persone anziane e in quelle immunocompromesse. Nei Paesi del Sud del mondo, al contrario, causa la morte di almeno 600 mila bambini ogni anno per diarrea, secondo le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità che considera la malattia una vera e propria emergenza sanitaria. In media circa 1 bambino su 40 necessita del ricovero in ospedale per la somministrazione di fluidi per via



endovenosa, ma di solito il trattamento è aspecifico e consiste nella reidratazione per via orale per compensare la perdita di liquidi. È proprio la difficoltà di reidratare con abbondanti quantità di acqua sicura e pulita il principale rischio per la vita di molti bambini del Sud del mondo.

La principale via di trasmissione del virus è quella oro-fecale. Poiché il virus è stabile nell'ambiente, la trasmissione può avvenire attraverso l'ingestione di acqua o cibo contaminato o a causa del contatto con superfici contaminate.

La diagnosi viene effettuata ricercando antigeni specifici del *rotavirus* all'interno di campioni fecali prelevati dal paziente. Il ceppo coinvolto può essere ulteriormente caratterizzato tramite saggi immunoenzimatici o molecolari. (28)

## **1.7 ARPA E VALIDAZIONE**

Il decreto legislativo 31/2001, destinato a definire le norme in materia di acque destinate al consumo umano, contiene le procedure necessarie per garantire i controlli sulle acque, i piani e le competenze degli enti pubblici in materia di campionamenti.

I controlli interni ed esterni intesi a garantire che le acque destinate al consumo umano soddisfino i requisiti del presente decreto devono essere effettuati:

- a) ai punti di prelievo delle acque superficiali e sotterranee da destinare al consumo umano;
- b) agli impianti di adduzione, di accumulo e di potabilizzazione;
- c) alle reti di distribuzione;
- d) agli impianti di confezionamento di acqua in bottiglia o in contenitori;
- e) sulle acque confezionate;
- f) sulle acque utilizzate nelle imprese alimentari;
- g) sulle acque fornite mediante cisterna, fissa o mobile.

Nei casi in cui la disinfezione rientri nel processo di preparazione o di distribuzione delle acque destinate al consumo umano, i controlli devono verificare l'efficacia della disinfezione e accertare che la contaminazione da presenza di sottoprodotti di disinfezione sia mantenuta al livello più basso possibile senza compromettere la disinfezione stessa.

I laboratori di analisi devono seguire procedure di controllo analitico della qualità sottoposte periodicamente al controllo del Ministero della Salute, in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità.

Si indicano come controlli interni quelli effettuati dal gestore del servizio idrico integrato per la verifica della qualità dell'acqua destinata al consumo umano. I punti di prelievo dei controlli interni possono essere concordati con l'azienda unità sanitaria locale.

Per l'effettuazione dei controlli il gestore del servizio idrico integrato si avvale di laboratori di analisi interni, ovvero stipula apposita convenzione con altri gestori di servizi idrici. I risultati dei controlli devono essere conservati per un periodo di almeno cinque anni per l'eventuale consultazione da parte dell'amministrazione che effettua i controlli esterni.

I controlli esterni sono quelli svolti dall'AUSL territorialmente competente, per verificare che le acque destinate al consumo umano soddisfino i requisiti del presente decreto, sulla base di programmi elaborati secondo i criteri generali dettati dalle regioni in ordine all'ispezione degli impianti, alla fissazione dei punti di prelievo dei campioni da analizzare, anche con riferimento agli impianti di distribuzione domestici, e alle frequenze dei campionamenti, intesi a garantire la significativa rappresentatività della qualità delle acque distribuite durante l'anno.

L'AUSL assicura una ricerca supplementare, caso per caso, delle sostanze e dei microrganismi per i quali non sono stati fissati valori di parametro a norma nell'allegato I, qualora vi sia motivo di sospettarne la presenza in quantità o concentrazioni tali da rappresentare un potenziale pericolo per la

salute umana. La ricerca dei parametri supplementari è effettuata con metodiche predisposte dall'Istituto Superiore di Sanità.

L'AUSL comunica i punti di prelievo fissati per il controllo, le frequenze dei campionamenti e gli eventuali aggiornamenti alla competente regione o provincia autonoma ed al Ministero della Salute entro il 31 dicembre 2001 e trasmette gli eventuali aggiornamenti entro trenta giorni dalle variazioni apportate.

Per le attività di laboratorio le AUSL si avvalgono delle Agenzie regionali per la protezione dell'ambiente (ARPA), sulla base dell'articolo 7-quinquies del decreto legislativo 30 dicembre 1992, n. 502. I risultati delle analisi eseguite sono trasmessi mensilmente alle competenti regioni o province autonome ed al Ministero della Salute, secondo le modalità stabilite rispettivamente dalle regioni o province autonome e dal Ministero della Salute. I laboratori di analisi devono seguire procedure di controllo analitico della qualità sottoposte periodicamente al controllo del Ministero della Salute, in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità. (29)

L'introduzione di un sistema di gestione per la qualità permette di razionalizzare e ottimizzare i processi gestionali e produttivi, e la certificazione consente di dimostrare, mediante la dichiarazione di un ente indipendente ufficialmente riconosciuto, che ARPA risponde ai requisiti della norma di riferimento ed è in grado di assicurare costantemente per i propri prodotti/servizi il livello di qualità dichiarato.

La qualità dei dati prodotti dai laboratori impegnati nel controllo analitico (controllo ufficiale, monitoraggi ambientali, ecc.) è importante per dimostrare la propria competenza tecnica ed affidabilità.

Il riconoscimento formale della competenza tecnica e gestionale dei laboratori ad effettuare determinati tipi di prove, definito accreditamento, è rilasciato da un organismo indipendente e rappresentativo di tutte le parti inte-

ressate, che garantisce gli utenti, attraverso verifiche documentali e tecniche periodiche, sulla competenza ed imparzialità dei laboratori nella effettuazione delle prove accreditate. La certificazione è il primo passo di un percorso di crescita mirato al miglioramento continuo dei processi aziendali, divenendo una garanzia del costante impegno profuso da ARPA per il raggiungimento degli obiettivi di qualità, il loro mantenimento e miglioramento, nonché la ricerca della reciproca soddisfazione nei rapporti con clienti e fornitori.

I requisiti che un laboratorio deve rispettare per dimostrare che opera secondo un sistema di gestione, che è tecnicamente competente ed è in grado di generare risultati tecnicamente validi, sono stabiliti dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 che promuove l'adozione di un approccio per processi nello sviluppo, attuazione e miglioramento dell'efficacia di un sistema di gestione della qualità, al fine di accrescere la soddisfazione del cliente. Un ente che decide di ottenere la certificazione deve dotarsi di un sistema di gestione documentato (manuale, procedure, ecc.) e lo utilizza operativamente secondo i requisiti della documentazione stessa e della norma. L'ARPA Valle d'Aosta, per poter operare per conto del sistema nazionale sanitario, deve provare la propria competenza ad operare utilizzando metodi accreditati e mantenere un sistema di gestione controllato e documentato, così da ottenere l'attestato di certificazione rilasciato da un ente competente. L'attestato di certificazione è rilasciato da un Organismo di Certificazione indipendente ed accreditato, nel caso di ARPA questo ente è rappresentato da ACCREDIA.

ACCREDIA rappresenta l'organismo di accreditamento italiano, il quale, operando secondo la norma ISO/IEC 17011 (30), verifica e sorveglia nel tempo la conformità dei Laboratori rispetto ai requisiti indicati nella norma ISO/IEC 17025, quali direzione e personale addetto di adeguata esperienza

e competenza, utilizzo di apparecchiature, impianti ed ambienti idonei per l'effettuazione delle prove previste, metodi e procedure di prova adeguati. La procedura di accreditamento è stata messa a punto dall'Unione Europea al fine di permettere la libera circolazione di merci e prodotti sul territorio comunitario, senza necessità di controlli ripetitivi da parte delle autorità dei vari Paesi. I rapporti di prova emessi dai laboratori accreditati vengono accettati anche all'estero, ciò permette di evitare la ripetizione delle analisi da parte delle autorità dei Paesi di esportazione. (31)

Ai fini dell'accREDITAMENTO in funzione dei requisiti della ISO/IEC 17025 (32) e di quelli stabiliti da ACCREDIA, si distinguono due tipi di metodiche di laboratorio:

1) i metodi ufficiali, ovvero riportati o richiamati in documenti normativi cogenti e/o pubblicati sulla Gazzetta Ufficiale Italiana (GU) o su quella dell'Unione Europea (GUCE), o comunque richiamati o riportati in un documento emesso da una autorità quale Regione, Provincia o Stato. La qualifica ufficiale è una proprietà trasversale, indipendente dal grado di esaurività dei contenuti. Un metodo ufficiale può essere "normalizzato" o "non normalizzato". I metodi normalizzati sono metodi emessi da organismi di normazione nazionali, europei o internazionali (es. UNI, CEI, ISO). I metodi normalizzati sono descritti in protocolli ben definiti in cui sono riportati i limiti degli intervalli in cui devono essere compresi i valori di quasi tutti i parametri di interesse e, anche se non sempre, i dati dei parametri di precisione ricavati dalla validazione del soggetto che li ha emessi (ad esempio prove inter laboratorio per uno o più matrici di riferimento). Quando il laboratorio dichiara di seguire tali metodi deve distinguere tra quelli che riportano dati dei parametri di precisione (ripetibilità e riproducibilità) e quelli che non li riportano, per stabilire le modalità da attuare al fine di dimostrare la propria capacità (competenza) ad eseguirli. Nel primo caso è sufficiente ottenere dati della propria ripetibilità, da confrontare con quelli

resi disponibili dal metodo (verifica del limite di ripetibilità). Nel secondo caso è necessario produrre sperimentalmente dati di ripetibilità intermedia a cui attribuire l'indicazione di ripetibilità del metodo e confrontarla con i dati di ripetibilità stretta del laboratorio stesso.

Si considerano invece metodi di prova non normalizzati quelli emessi da organizzazioni tecniche nazionali o internazionali (metodi AOAC, Rapporti ISTISAN, Quaderni IRSA, Metodi ISPRA), norme di prova prodotte da industrie, istruzioni del produttore. (33)

2) Si definiscono metodi interni i metodi di prova sviluppati, messi a punto o adottati da un laboratorio sulla base di conoscenze desunte dalla letteratura scientifica e/o dall'esperienza pratica. Il metodo interno può essere sia un metodo interamente sviluppato dal laboratorio, sia un metodo (normalizzato o non) che è stato sostanzialmente modificato a seguito di particolari esigenze del laboratorio.

La validazione di un metodo analitico è il processo attraverso il quale si stabilisce, tramite studi di laboratorio, che le prestazioni caratteristiche del metodo siano adeguate per l'applicazione che se ne intende fare. Nell'affrontare uno studio per la validazione di un metodo specifico è innanzitutto opportuno definire un protocollo che indichi quali parametri valutare, le prove da svolgere e i metodi statistici per l'analisi dei dati. Nella pratica è in genere possibile strutturare il lavoro sperimentale in modo tale da valutare più parametri con le stesse prove. Gli studi effettuati, i risultati, l'analisi dei dati e le conclusioni devono essere riportati in un rapporto finale.

La validazione primaria è un processo sperimentale atto a stabilire i limiti operativi e le prestazioni (performance) di un nuovo protocollo metodologico, al fine di dimostrare che tale metodo (con quei limiti e prestazioni) è adeguato all'utilizzazione prevista/concordata.

Un apposito documento descriverà dettagliatamente ed in modo non ambiguo i risultati numerici della sperimentazione, le eventuali modifiche apportate alla procedura di prova, nonché tutto quello che può influenzare le prestazioni del metodo.

Per i metodi chimici e microbiologici la validazione primaria prevede o il confronto con altri metodi normalizzati in uso, secondo quanto indicato dalla norma ISO/IEC 17025, o il confronto con una precisione teorica predefinita per lo scopo ed il campo di applicazione previsto.

La validazione secondaria, detta anche di verifica, è richiesta per i metodi sviluppati e validati (validazione primaria) da altri (metodi normalizzati e/o ufficiali) e dimostra che il laboratorio è in grado di applicare un metodo validato conformemente alle specifiche stabilite nella validazione primaria. A tale scopo è necessario documentare le prestazioni del metodo a lungo termine.

Per i metodi normalizzati o ufficiali che non riportano tutte le specifiche richieste dalla validazione primaria, perché ad esempio non sono disponibili i dati di riproducibilità, la validazione secondaria può essere completata con la partecipazione a circuiti esterni di assicurazione della qualità.

In sintesi, per validazione primaria si deve intendere la validazione del metodo, mentre la validazione secondaria è la convalida del processo di esecuzione della prova riferita ai vincoli imposti dal metodo (validazione del processo). (34)

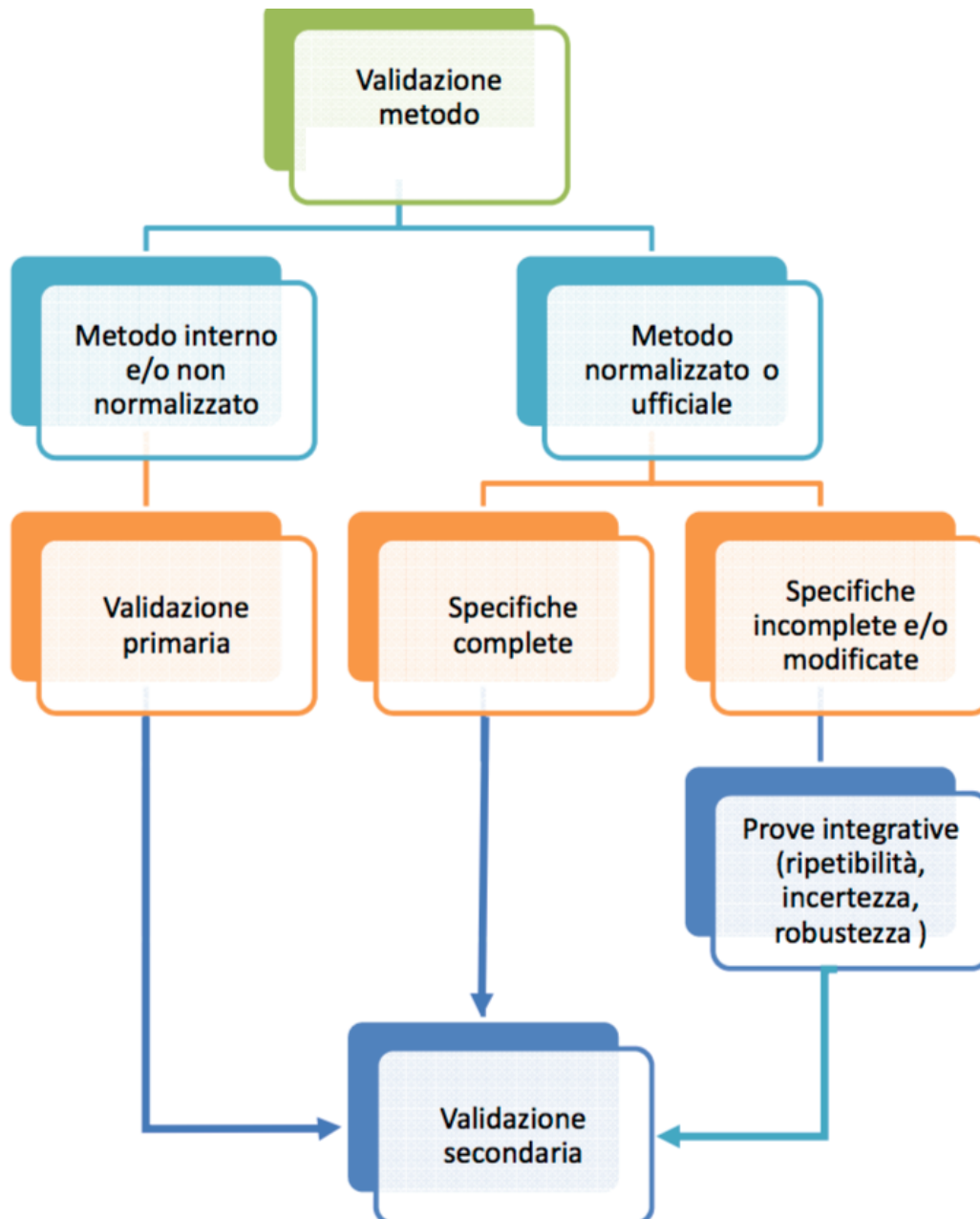


Fig 1-4 Schema generale per la validazione di un metodo analitico



I parametri valutati in corso di validazione sono riportati nello schema seguente (Fig1-5) (35).

<b>Sensibilità</b>	<b>Specificità (selettività)</b>	<b>Campo di applicazione</b>	<b>Campo di misura</b>
<b>Limite di rilevabilità</b>	<b>Limite di determinazione o quantificazione</b>	<b>Linearità</b>	<b>Accuratezza</b>
<b>Esattezza</b>	<b>Precisione, ripetibilità e riproducibilità</b>	<b>Incertezza</b>	<b>Robustezza</b>

Fig1-5: Principali parametri valutati in corso di validazione primaria in accordo con la ISO 13843.

Nel presente lavoro si utilizzeranno alcune prove caratteristiche della validazione quali ripetibilità, riproducibilità, incertezza di misura, sensibilità, specificità, selettività, indice di dispersione. Queste prove sono utili per valutare le performance dei metodi in esame e confrontarli in maniera scientifica.

## **1.8 CAMPIONAMENTO**

Per valutare la qualità di una fonte d'acqua è necessario prelevarne un'aliquota per poter svolgere l'analisi di laboratorio ma, proprio per la limitazione e la relativa imprecisione intrinseca dell'analizzare un campione, è necessario applicare un protocollo specifico per prelevare l'acqua senza contaminarla e cercando di recuperare un'aliquota il più possibile rappresentativa dell'intera fonte d'acqua.

Il campionamento è una parte fondamentale dell'analisi in quanto se svolto in modo impreciso rende inutile e non conforme tutta l'analisi successiva,

dando risultati che non sono veritieri. Per questo è stata redatta la ISO 19458 (36) che definisce le modalità di prelievo, le modalità di trasporto e di conservazione dell'acqua prima dell'arrivo in laboratorio.

Il contenitore in cui raccogliere il campione deve avere delle caratteristiche precise:

- capienza compresa tra 500-1000 ml;
- essere sterile; composto da materiali che ne consentano la sterilizzazione come la plastica o il vetro;
- in caso di acque trattate con cloro o altri disinfettanti deve contenere tiosolfato che è in grado di inattivare la funzione antimicrobica del cloro e dei disinfettanti, e che deve essere aggiunto nella quantità di 0,1 ml per ogni 100 ml di campione.

Un campionamento puntiforme ha poca utilità, in quanto si valuta esclusivamente la condizione dell'acqua in un dato momento, risulta invece più utile campionare periodicamente una data fonte d'acqua, così da determinare la salubrità. La ISO europea 25667 (37) descrive i piani di campionamento relativi alle acque, dando un senso ai prelievi e alle analisi effettuate. In particolare si descrivono i piani di campionamento utili per il monitoraggio biologico di corsi d'acqua, di acque potabili e di balneazione.

È utile definire un piano di campionamento con approccio sperimentale, in base agli obiettivi del campionamento (monitoraggio, potabilizzazione, ecc.). L'approccio sperimentale comprende la scelta di un campione che dal punto di vista analitico sia rappresentativo della globalità dell'acqua prelevata. Il numero di campioni che si dovrebbe analizzare secondo la statistica è spesso troppo alto rispetto alle reali condizioni economiche e logistiche dei laboratori che effettuano gli studi.

Il prelievo deve essere effettuato in maniera tale da mantenere inalterate le caratteristiche chimiche e microbiologiche dell'acqua fino al momento dell'analisi. La conservazione del campione deve essere fatta in modo tale

da evitare modificazioni dei componenti e delle caratteristiche da valutare. Concetti molto semplici ma che sono di difficile attuazione, perché dal momento in cui viene prelevato il campione non rappresenta più la totalità del punto di prelievo e inizia a modificare i propri parametri.

La metodica di campionamento è diversa a seconda del tipo di acqua che si sta per analizzare, in particolare per le acque destinate all'uso umano si possono distinguere diverse tipologie: acque di rubinetto, acque in bottiglia, acque di pozzo o falda.

Per l'acqua di rubinetto è previsto il seguente procedimento:

- 1- rimuovere dal rubinetto tutti i dispositivi o filtri;
- 2- rimuovere dalla bocca del rubinetto ogni segno di sporcizia e residui;
- 3- far scorrere l'acqua due o tre volte per 5-10 secondi per volta;
- 4- disinfettare alla fiamma il rubinetto, per un tempo né troppo breve né eccessivo;
- 5- far scorrere l'acqua a flusso intermedio e intanto misurare la temperatura finché non diventa stabile;
- 6- aprire la bottiglia sterile senza toccare la parte interna del tappo, riempirla lasciando uno spazio vuoto per permettere l'omogeneizzazione del campione, chiudere immediatamente con il tappo dopo il prelievo;
- 7- il campione prelevato deve essere etichettato in modo chiaro con tutte le indicazioni necessarie ad una corretta identificazione;
- 8- i campioni devono essere trasportati in laboratorio al più presto, minimizzando il tempo che intercorre tra prelievo e analisi (massimo entro 8 ore), attenendosi alle tempistiche elencate nell'Annesso B della norma UNI EN ISO 19458;
- 9- i campioni devono essere conservati durante il trasporto ad una temperatura di  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ;
- 10- all'arrivo in laboratorio i campioni sono posti in frigorifero a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ;

11- si eseguono tre tipi di campionamento diversi per controllare tutto il percorso dell'acqua fino al consumatore. (Tabella 1-3)

<b>Tipo di acqua</b>	<b>Rimozione dispositivi</b>	<b>Disinfezione</b>	<b>Flussaggio (far scorrere l'acqua)</b>
Acqua di rete	Si	Si	Si
Acqua nell'impianto	Si	Si	No
Acqua consumata dall'utente	No	No	No

Tabella 1-3: Tipologie di campionamento in base al luogo del prelievo dell'acqua di rubinetto.

Il procedimento per le acque in bottiglia è il medesimo di quello descritto in precedenza con l'unica differenza di non sterilizzare la bottiglia prima del prelievo, in quanto la bottiglia da cui eseguo il prelievo deve essere già sterile.

Il procedimento di prelievo delle acque di pozzo o falda è simile a quello per le acque di rubinetto, si eseguono anche in questo caso tre prelievi differenti per seguirne il percorso fino al momento del consumo da parte dell'utente (Tabella 1-4). Questo permette, in caso di contaminazione, di risalire alla causa del problema più rapidamente e in modo più efficace.

<b>Tipo di acqua</b>	<b>Disinfezione</b>	<b>Flussaggio</b>
Acqua di falda	Si	Si
Acqua di pozzo	Si	No
Acqua consumata dall'utente	No	No

Tabella 1-4: Tipologie di prelievo in base al luogo di prelievo dell'acqua di pozzo o falda.

Il trasporto del campione è fondamentale per garantire una modificazione minima dei parametri che si andranno a valutare; risulta quindi importante mantenere la temperatura dei campioni a  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$  e tenerli lontani dalla luce solare.

## **1.9 GENERALITA' DEL METODO**

I metodi che verranno valutati in questo lavoro sono specifici per acque solitamente poco contaminate, in quanto per le acque troppo contaminate, come ad esempio le acque reflue, risultano poco specifici e non permettono una identificazione precisa dei batteri isolati su capsule Petri, infatti le colonie risulterebbero sovrapposte e poco distinguibili le une dalle altre.

Le acque destinate al consumo umano risultano essere poco contaminate, è necessario quindi concentrare il campione da analizzare al fine di poter isolare gli eventuali batteri presenti in soluzione. Il metodo della filtrazione su membrana risulta essere il migliore. Questa tecnica prevede la filtrazione di un certo volume di acqua da analizzare attraverso una membrana di nitrocellulosa che possiede pori aventi diametro differente che va da 0,2 a 0,65  $\mu\text{m}$  come previsto dalla norma ISO 7704 (38). Su queste membrane viene

valutato il tasso di coliformi trattenuti e il tasso di recupero relativo in rapporto alle dimensioni dei pori, dopo crescita su specifico terreno di coltura. Il diametro scelto in base alle prove effettuate dai laboratori di prova è di 0,45  $\mu\text{m}$ .

I materiali utilizzati per il processo di filtrazione su membrana sono i seguenti:

- 1) vetreria composta da due parti: una parte con guaina di gomma per collegarsi nell'alloggiamento della pompa a vuoto, una seconda parte, il bicchiere graduato, che viene sistemata sopra e consente di posizionare la membrana tra le due parti di vetro;
- 2) una pompa a vuoto, necessaria per filtrare l'acqua (la pressione esercitata non deve essere eccessiva per evitare di rompere la parete batterica e la membrana);
- 3) pinzette di ferro, utili per posizionare la membrana senza contaminarla;
- 4) un becco bunsen per garantire la sterilità delle pinzette.

La procedura di filtrazione su membrana comune sia ai metodi APAT-CNR-IRSA 7030C/7010C sia al metodo ISO 9308-1 del 2014 è descritta di seguito:

- montare il sistema di filtraggio e posizionare la membrana di esteri di cellulosa tra le parti del sistema filtrante;
- agitare il campione per 20 volte;
- versare 100 ml di acqua nella struttura di vetro;
- azionare la pompa a vuoto e aspettare che tutta l'acqua venga filtrata, rimuovere la membrana e sistemarla sulla piastra rivolta con la parte filtrata verso l'esterno (sopra) della piastra;
- incubare per tempi e temperatura specifici a seconda del terreno di coltura usato.

I vantaggi della metodica di filtrazione su membrana sono:

- maggiore esattezza della conta rispetto al metodo diretto;

- si possono esaminare volumi di campione molto più grandi;
- la concentrazione aumenta l'accuratezza della conta batterica;
- si ottengono risultati quantitativi.

Le colonie visibili possono essere rapportate direttamente al volume di campione attraverso la formula presente nella ISO 8199 (39):

$$Cs = \frac{Z}{V_{tot}} \times Vs$$

Dove:

- Z è il numero di colonie contate
- Vs è il volume di riferimento del campione
- Cs è la concentrazione batterica nel volume totale di campione
- $V_{tot} = (n \times V \times d) + \dots$  dove n è il numero di campioni, V è il volume testato e d è la diluizione.

## SCOPO DEL LAVORO

Il presente studio si prefigge di confrontare la metodica ISO 9308-1 del 2014 con la metodica APAT IRSA CNR 7030C del 2003 relativa alla ricerca del batterio *Escherichia coli* e con la metodica APAT IRSA CNR 7010C del 2003 relativa ai batteri coliformi totali. Lo scopo del lavoro è quello di valutare la metodica migliore sulla base di dati statistici e sulla base della praticità di utilizzo rispetto alle esigenze operative dell'ARPA Valle d'Aosta.

I metodi APAT IRSA CNR 7030C/7010C sono metodi alternativi alla ISO 9308-1 in vigore fino a dicembre del 2000. La necessità di utilizzare un metodo alternativo, non previsto dalla norma, è dovuto alla esigenza di ridurre i tempi di risposta da più di due giorni a 24 ore. Dal gennaio 2014 è entrata in vigore una nuova norma ISO 9308-1, sostitutiva della precedente, che prevede un cambio radicale nella procedura operativa da adottare per la ricerca di batteri coliformi ed *E. coli* e limita a 24 ore i tempi di risposta. Questo cambiamento impone al laboratorio di microbiologia dell'ARPA di attivare uno studio per verificare la compatibilità di tale metodo relativamente ai campioni analizzati, alle apparecchiature presenti e al personale operante nel settore.

Per valutare la compatibilità del metodo è necessario confrontarla con i metodi utilizzati in precedenza (APAT IRSA CNR 7030C/7010C) e determinare, anche attraverso test statistici, i tempi di risposta, la semplicità di lettura e di discriminazione delle colonie caratteristiche e gli indici di performance. Oltre all'aspetto prettamente statistico è fondamentale analizzare ogni aspetto applicativo del metodo, in particolare deve essere valutata la semplicità nella conta e nella discriminazione degli organismi bersaglio, i tempi di risposta e di analisi, i costi.

Il lavoro si articola in due parti:



1- Nella prima parte si valuteranno le performance analitiche dei metodi rispetto alla ISO 13843.

I dati utilizzati sono ricavati da inoculi preparati in laboratorio con concentrazioni note dei batteri di interesse. L'utilità è data dal fatto che i campioni di routine sono di solito poco contaminati, mentre per creare statistiche affidabili sono necessari campioni con contaminazioni più elevate, al fine di generare dati quantitativi relativi alle performance dei metodi.

2- Nella seconda parte si andranno a valutare in modo qualitativo i metodi utilizzando 281 campioni di routine, in accordo con la ISO 16140. Di questi campioni è possibile solo una valutazione qualitativa poiché molti di essi sono negativi o poco contaminati, proprio perché ricavati da acque destinate al consumo umano.

Il confronto tra i metodi è facilitato dal fatto che entrambe le metodiche sono basate sul principio di filtrazione su membrana e sulla successiva incubazione in capsule Petri a 37°C per 18-24h. L'utilizzo dello stesso metodo abbinato ad un tempo e temperatura di incubazione sovrapponibili permette di confrontare in modo più specifico l'efficacia dei mezzi di coltura utilizzati.

## MATERIALI E METODI

### 3.1 Metodo APAT-CNR-IRSA 7030 C Man 29 2003 per *Escherichia coli*

Il metodo permette il conteggio di colonie di *E. coli* cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato addizionato con sostanze cromo-gene denominato C-EC agar medium. L'incubazione per 18-24 ore alla temperatura di  $44\pm 1^{\circ}\text{C}$  permette la crescita di colonie tipiche verde-blu, fluorescenti alla luce ultravioletta, che rappresentano le colonie di *E. coli*. Le colonie di batteri coliformi si presentano con colonie tipiche verde-blu, non fluorescenti alla luce ultravioletta.

#### 3.1.1 MATERIALI

I materiali necessari alla filtrazione su membrana sono stati trattati nel paragrafo “Generalità del metodo”. In aggiunta a questi materiali è necessaria altra strumentazione:

- Autoclave, per la sterilizzazione in accordo con la ISO 8199
- Incubatore controllato termostaticamente a temperatura di  $44\pm 1^{\circ}\text{C}$
- pH metro, con accuratezza di 0,1
- Filtro a membrana con pori di  $0,45\ \mu\text{m}$
- Pinze sterili
- Lampada di Wood tarata per osservazione a 336 nm

Per la preparazione dei terreni di coltura in laboratorio si fa riferimento alle norme ISO 8199e ISO 11133(40). La composizione e le istruzioni operative riguardanti la preparazione dei terreni sono descritte di seguito.

<b>C-EC agar medium</b>	
Triptosio	10 g
Triptofano	1 g
Peptocomplesso	5 g
Estratto di lievito	3 g
Sodio cloruro	5 g
Sali di bile N 3	1,5 g
IPTG	0,1 g
5-Br-4Cl-3-indolil-D-galactopiranoside	0,08 g
4-metilumbelliferil-beta-D-glucuronide	0,05 g
Agar Bios LL	13 g
Acqua distillata	1000 ml

Dopo aver disciolto la polvere in acqua, sterilizzare a  $115\pm 1^{\circ}\text{C}$  per 15 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare.

Conservare a circa  $4^{\circ}\text{C}$  per non più di due settimane in condizioni ottimali.

### **3.1.2 PROCEDIMENTO**

La fase di preparazione del campione è stata descritta nel paragrafo “Generalità del metodo”.

In seguito alla filtrazione porre la membrana sulla piastra e procedere all’incubazione a  $44\pm 1^{\circ}\text{C}$  per 18-24 ore.

*Escherichia coli* sviluppa colonie tipiche di colore verde-blu che risultano fluorescenti alla luce ultravioletta, mentre le colonie atipiche sono biancastre o incolori. Le colonie verde-blu che non risultano fluorescenti rappresentano i batteri coliformi. Le colonie che risultano gialle sono colonie contaminanti di batteri quali ad esempio *Pseudomonas aeruginosa*.

### 3.1.3 ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il numero di *E. coli* si calcola in base al numero di colonie contate, riportando il valore in unità formanti colonie (UFC) per 100 ml. La formula per calcolare il numero di batteri in 100 ml di campione in accordo con la ISO 8199 è la seguente:

numero di unità formanti colonia nell'unità di volume (Cs):

$$Cs = \frac{Z}{V_{tot}} \times Vs$$

Dove:

- Z è il numero di colonie contate
- Vs è il volume di riferimento del campione
- Cs è la concentrazione batterica nel volume totale di campione
- $V_{tot} = (n \times V \times d) + \dots$  dove n è il numero di campioni, V è il volume testato e d è la diluizione. (41)

### 3.2 Metodo APAT-CNR-IRSA 7010 C Man 29 2003 per batteri coliformi totali

Con questo metodo viene calcolata la concentrazione di batteri coliformi totali che sono presenti in un campione di acqua, filtrando un'aliquota di campione attraverso una membrana di nitrocellulosa e ponendo la stessa in coltura nello specifico terreno. Le colonie caratteristiche si presentano verde-blu.

### **3.2.1 MATERIALI**

I materiali necessari alla filtrazione su membrana sono stati trattati nel paragrafo “Generalità del metodo”. In aggiunta a questi materiali è necessaria altra strumentazione presentata nel paragrafo 3.1.1.

### **3.2.2 PROCEDIMENTO**

La fase di preparazione e filtrazione è stata descritta nel paragrafo “Generalità del metodo”. In seguito alla filtrazione porre la membrana sulla piastra e procedere all’incubazione a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  per 18-24 ore. Sono considerate coliformi totali le colonie di colore verde-blu cresciute entro il tempo delle  $24\pm 2$  ore.

In caso di colonie dalle caratteristiche dubbie, è possibile procedere, per la verifica dell’appartenenza alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, alla prova della citocromo ossidasi, che permette di differenziare i microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi in base alla presenza dell’enzima citocromo ossidasi. I coliformi sono ossidasi-negativi.

### **3.2.3 ESPRESSIONE DEI RISULTATI**

Il numero di batteri coliformi totali si calcola in base al numero di colonie contate, riportando il valore in unità formanti colonie per 100 ml. La formula per calcolare il numero di batteri in 100 ml di campione è presente nel paragrafo 3.1.3. (42)

### **3.3 Metodo ISO 9308-1 2014 per *E. coli* e batteri coliformi**

Il metodo è specifico per la ricerca di *Escherichia coli* e batteri coliformi in un campione di acqua. Il metodo si basa sulla filtrazione di un’aliquota del campione su una membrana e successiva incubazione sul terreno differenziale Cromogenic Coliform Agar (CCA).

La crescita delle colonie tipiche avviene in 24 ore e permette di differenziare i coliformi dall' *E. coli* direttamente sulla stessa piastra, sulla base della positività alla beta-D-galattosidasi e alla beta-D- glucuronidasi (*E. coli* O157 non sarà identificato come tale perché non ha attività glucuronidasi, sarà compreso quindi nei coliformi). Le colonie di *E. coli* risultano positive sia alla beta-D-galattosidasi che alla beta-D- glucuronidasi, mentre le colonie di batteri coliformi (escluso *E. coli*) sono positive alla beta-D-galattosidasi mentre sono negative alla beta-D-galattosidasi. Le colonie di *E. coli* si presentano con una colorazione blu-viola, mentre le colonie di batteri coliformi (eccetto *E. coli*) si presentano di colore rosa-rosso.

### **3.3.1 MATERIALI**

I materiali necessari alla filtrazione su membrana sono stati trattati nel paragrafo “Generalità del metodo”. In aggiunta a questi materiali è necessaria altra strumentazione:

- Autoclave, per la sterilizzazione; in accordo con la ISO 8199
- Incubatore controllato termostaticamente a temperatura di  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$
- pH metro, con accuratezza di 0,1
- Filtro di membrana con pori di  $0,45\ \mu\text{m}$
- Pinze sterili

Per la preparazione dei terreni di coltura in laboratorio si fa riferimento alle norme ISO 8199 e ISO 11133. La composizione e le istruzioni operative riguardanti la preparazione dei terreni sono riportate di seguito.

<b>Cromogenic coliform agar (CCA)</b>	
Digerito enzimatico di caseina	1 g
Estratto di lievito	2 g
Cloruro di sodio	5 g
Diidrogenofosfato di sodio	2,2 g
Idrogenofosfato di sodio	2,7 g
Piruvato di sodio	1 g
Sorbitolo	1 g
Triptofano	1 g
Tergitol 15-S-7 surfactante	0,15 g
6-cloro-3-indosil-beta-D-galactopiranoside ( Salmon-beta-D-galactoside)	0,2 g
5-bromo-4-cloro-3-indosil-beta-D-acido clucuronico, sale cicloesilammonio monoidrato ( sale X-beta-G-glicuronide CHX	0,1 g
Isopropil-beta-D-tiogalactopiranoside ( IPTG)	0,1 g
Agar batteriologico	Da 9 g a 18 g
Acqua	1000 ml

Miscelare gli ingredienti mediante riscaldamento, mescolando senza che si creino bolle. Controllare il pH che deve essere di  $6,8 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Distribuire in capsule Petri a uno spessore di almeno 4 mm. Se non vengono utilizzate subito, le piastre si possono conservare a  $5 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  al buio per un massimo di un mese. Non sterilizzare in autoclave.

- Reagenti:

Il reagente ossidasi viene utilizzato per confermare le colonie cresciute come rosa-rosse sul terreno. Per effettuare la prova è necessario prelevare la colonia presunta e toccare la striscia di reagente, attendere 30 secondi

per il completamento della reazione. Se il punto toccato presenta una colorazione blu è segno di reazione positiva all'ossidasi, quindi non si tratta di un batterio coliforme, mentre se non è presente alcun viraggio di colore è confermato il batterio coliforme.

Reagente per ossidasi	
N,N,N,N-tetrametil-p-diaminofenilene idrocloride	0,1 g
Acqua distillata	10 ml

Il reagente è poco stabile perciò va preparato fresco ogni qualvolta sia necessario e va tenuto lontano dalla luce.

### 3.3.2 PROCEDIMENTO

La fase di preparazione e filtrazione è stata descritta nel paragrafo "Generalità del metodo".

Dopo la filtrazione, posizionare la membrana sul CCA, assicurandosi che non ci siano bolle d'aria tra il filtro e la superficie del terreno. Incubare a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  per  $21\pm 3$  ore.

Esaminare la piastra e contare tutte le colonie che risultano positive alla beta-D-galattosidasi, che risultano di colore rosa-rosso e rappresentano i batteri coliformi. Contare le colonie che risultano positive alla beta-D-galattosidasi e alla beta-D-glucuronidasi, che risultano di colore blu-viola e rappresentano gli *E. coli*. Se sono presenti colonie di *Pseudomonas aeruginosa* come contaminanti crescono come colonie gialle.

Per confermare che le colonie presunte, di colore rosa-rosso, non siano falsi positivi rappresentati da ceppi batterici non coliformi è necessario effettuare un test di conferma basato sulla reazione con un reagente ossidasi, con il seguente procedimento:



- Bagnare una carta da filtro con due o tre gocce di reagente ossidasi di preparazione fresca
- Prelevare tutte o una quantità rappresentativa di almeno 10 colonie rosa-rosso con una ansa di platino o di plastica
- La reazione risulta positiva se in 30 secondi al massimo si ha una colorazione blu scuro.

### 3.3.3 ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il conteggio dei batteri coliformi risulta dalla somma di tutte le colonie rosa-rosso più tutte le colonie blu-viola, mentre le colonie di *E. coli* sono la somma di tutte le colonie blu-viola. Le colonie di altri colori (es gialle, beige) sono dei contaminanti.

Il calcolo del numero di batteri coliformi ed *E. coli* presenti in 100 ml di campione in accordo con la ISO 8199 è svolto con la seguente formula: numero di unità formanti colonie nel l'unità di volume (Cs):

$$Cs = \frac{Z}{V_{tot}} \times Vs$$

Dove:

- Z è il numero di colonie contate
- Vs è il volume di riferimento del campione
- Cs è la concentrazione batterica nel volume totale di campione
- $V_{tot} = (n \times V \times d) + \dots$  dove n è il numero di campioni, V è il volume testato e d è la diluizione. (43)

### 3.4 SCELTA DEI CAMPIONI

L'acqua destinata al consumo umano ha come prerogativa fondamentale di essere potabile, cioè rispettare parametri fisici, chimici e microbiologici che la rendono sicura e microbiologicamente pura, cioè priva di batteri patogeni e di batteri indice di contaminazione fecale (Capitolo 1, paragrafo 1.2 e 1.3).

Le acque considerate potabili e controllate periodicamente dall'ARPA sono le acque distribuite dagli acquedotti perciò l'acqua del rubinetto, le acque in bottiglia delle aziende produttrici, le acque di falda o pozzi.

Per procedere alla validazione di un metodo analitico è consigliabile, normalmente, utilizzare campioni con concentrazioni microbica più vicino possibile a quella della routine del laboratorio. Tuttavia, per valutare le caratteristiche prestazionali di un test di laboratorio nel caso della matrice "acqua destinata al consumo umano", che per definizione è poco contaminata, è necessario procedere ad una contaminazione artificiale del campione in laboratorio in modo da permettere un'elaborazione statistica dei risultati che sia significativa.

A questo scopo il lavoro è stato diviso in due parti:

- la sezione A che ha come scopo la valutazione delle prestazioni dei metodi secondo la ISO 13843, tramite l'utilizzo di campioni artificiali contaminati in laboratorio, con una carica batterica media.
- la sezione B che ha lo scopo di confrontare la performance dei metodi analitici considerati, in accordo con la ISO 16140 (44), tramite l'utilizzo di campioni naturali, analizzati nella routine del laboratorio e quindi poco contaminati.

## Sezione A

Relativa ai campioni filtrati da inoculi preparati in laboratorio con contaminazioni batteriche medie, utilizzando ceppi batterici di interesse in acqua sterile.

Nella ISO 13843 sono illustrate in dettaglio le motivazioni per cui è necessario utilizzare, per la validazione di un metodo, campioni a contaminazione media, tra 10 e 100 UFC/100 ml. Al di sotto e al di sopra di questo numero di colonie la precisione del risultato è troppo bassa per poter procedere ad una valutazione statisticamente significativa dei risultati.

Per preparare le sospensioni batteriche, necessarie per la contaminazione dei campioni artificiali, si prelevano, con l'ansa calibrata, le colonie cresciute in coltura pura dopo 24 ore di incubazione e si stemperano in una provetta contenente soluzione fisiologica, per arrivare a una torbidità di 0,5 McFarland, pari ad una sospensione batterica di circa  $10^8$  UFC/ml. Si procede poi a delle diluizioni seriali 1:10 in soluzione di peptone-sale per ottenere la sospensione batterica alla concentrazione desiderata, nel nostro caso  $10^2$  UFC/ml.

Il primo inoculo è preparato a partire da quattro provette contenenti una quantità di batteri pari a circa  $10^8$  batteri, che andranno diluite fino a  $10^2$  batteri. Si ottengono quattro provette di soluzione contenente ciascuna  $10^2$  batteri. Per controllare l'effettiva presenza dei batteri nell'inoculo, prelevare 1 ml da ogni provetta e seminarlo in Plate Count Agar per inclusione, mettendo poi a incubare per 24 ore a 36°C.

Per ottenere un campione da 1L si utilizza la seguente procedura:

- partire da 2 L di acqua sterile;
- aggiungere 1 ml di soluzione contenente 200 UFC di una specie batterica, si ripete l'aggiunta in base a quante specie batteriche sono necessarie per l'esperimento;

- agitare per inversione l'inoculo;
- dispensare in due bottiglie da 1L la soluzione;
- agitare prima di ogni filtrazione per omogeneizzare il contenuto batterico.

Per preparare il secondo inoculo è necessario raddoppiare le concentrazioni batteriche iniziali, in modo da avere una concentrazione finale doppia rispetto all'inoculo precedente. In questo caso si aggiunge 1 ml di soluzione contenente 400 UFC per specie batterica.

I batteri utilizzati sono gli stessi per entrambi gli inoculi e sono i seguenti:

- *Escherichia coli* ATCC 25922, che darà colonie tipiche sui terreni,
- *Citrobacter freundii* come batterio coliforme, isolato da campioni naturali,
- *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC27853 come batterio contaminante,
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Di seguito sono riportati i terreni e i diluenti utilizzati nella preparazione degli inoculi:

<b>Plate Count Agar</b>		
<b>Triptone</b>	5	g/L
<b>Estratto di lievito</b>	2,5	g/L
<b>Glucosio</b>	1	g/L
<b>Agar</b>	15	g/L

Sospendere la polvere in 1 L di acqua distillata fredda, portare poi ad ebollizione mescolando e autoclavare a 121°C per 15 minuti. Dispensare nelle capsule di Petri la soluzione liquida miscelando con il campione prima di far solidificare.

Peptone-Salt		
<b>Acqua distillata</b>	1	Litro
<b>Peptone</b>	1	g
<b>Sodio cloruro</b>	8,5	g

Miscelare fino a rendere omogenea la soluzione, dopo di che autoclavare a 121°C per 15 minuti.

Per ogni terreno sono stati analizzati 2 campioni a diverso livello di inoculo, filtrati 10 volte da due operatori diversi, ottenendo un totale di 40 risultati per ogni metodo analitico secondo il seguente schema:

operatore	APAT-CNR-IRSA 7030 C		APAT-CNR-IRSA 7010 C		ISO 9308-1 2014	
	Sospensione 2x10 <sup>2</sup>	Sospensione 10 <sup>2</sup>	Sospensione 2x10 <sup>2</sup>	Sospensione 10 <sup>2</sup>	Sospensione 2x10 <sup>2</sup>	Sospensione 10 <sup>2</sup>
<b>A</b>	10	10	10	10	10	10
<b>B</b>	10	10	10	10	10	10

In corrispondenza di ogni metodica sono indicati i numeri di campioni filtrati (sempre 10) per inoculo con diverse concentrazioni batteriche.

### **Sezione B**

Parte relativa alla filtrazione di campioni di routine, analizzati nel laboratorio di microbiologia dell'ARPA.

Sono stati analizzati 281 campioni di acqua raccolti dal 18/05/2015 al 24/08/2015.

A causa della scarsa contaminazione caratteristica delle acque destinate all'uso umano, con i dati prodotti sono state effettuate analisi statistiche considerando i risultati qualitativi, in particolare valutando la capacità dei metodi analitici confrontati di rilevare o meno la presenza di batteri di interesse. Per fare questo lo stesso campione di routine è stato analizzato con le diverse metodiche analitiche, questo consente di ricavare un dato confrontabile in quanto proveniente dal medesimo campione. In questo modo vengono valutate le prestazioni dei test secondo la ISO 16140 che prevede la comparazione statistica tra un metodo di riferimento e un metodo alternativo.

L'analisi statistica è svolta seguendo due linee principali in base allo scopo dei test statistici effettuati. Nella sezione A vengono analizzati i metodi in modo quantitativo rispetto ai parametri presenti nella ISO 13843, mentre nella sezione B vengono confrontati i metodi in modo qualitativo rispetto alla ISO 16140.

### **3.5 ANALISI STATISTICA**

L'analisi statistica è svolta seguendo due linee principali in base allo scopo dei test statistici effettuati. Nella sezione A vengono analizzati i metodi in modo quantitativo rispetto ai parametri presenti nella ISO 13843, mentre nella sezione B vengono confrontati i metodi in modo qualitativo rispetto alla ISO 16140.

#### **3.5.1 ANALISI STATISTICA SEZIONE A**

Il paragrafo 8 della ISO 13843 riporta i parametri principali da verificare per valutare la performance di un metodo analitico all'interno di un laboratorio, con i relativi valori di accettabilità associati. Essi sono:

- 1) sensibilità, capacità di un test di discriminare correttamente i positivi, per essere accettabile deve risultare  $>90$ . Ad essa sono associati altri parametri come la specificità, definita come capacità di un test di identificare correttamente i negativi; la selettività, che si riferisce alla capacità di un metodo analitico di determinare univocamente l'analita d'interesse, con valori  $>-1$  risulta buona, ma è accettabile fino a  $-2$ ;
- 2) l'incertezza del conteggio, definita come deviazione standard relativa (RSD) di una serie di filtrazioni replicate. Se si considerano ripetizioni dello stesso campione da parte di più operatori si definisce riproducibilità, con valore di RSD accettabile  $<0,05$ ; se si considerano ripetizioni dello stesso campione da parte di un operatore si definisce ripetibilità, con accettabilità  $<0,03$ ;
- 3) la dispersione di Poisson, verifica che le conte seriali rispettino la distribuzione di Poisson;
- 4) la quantificazione della sovradisersione, definibile come la componente dell'incertezza dovuta all'operatività, che può essere calcolata in due modi distinti: in accordo con l'articolo "*Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria*" presente sulla rivista Letters in Applied Microbiology (45), secondo il metodo di Anscombe, (1950) e l'approccio di regressione descritto nella ISO 13843 sezione 6.2.3.
- 5) la linearità del rilevatore, che dipende dalla selettività; essa è adeguata fino al numero di colonie limite, come presentato nel seguente schema:

Selettività	Limite superiore di linearità (numero di colonie target per piastra)
0	500 (coltura pura)
tra $-0,5$ e $-1$	200-100
tra $-1$ e $-2$	100-25
$< -2$	Solo valutazione qualitativa

6) campo di lavoro, secondo le indicazioni della ISO 8199 e della ISO/TR 13843, per avere un risultato statisticamente significativo è necessario avere circa 20 UFC per piastra. Tuttavia il livello di precisione raggiunto è ancora accettabile per conteggi tra 10 e 20. Al di sotto di questi numeri non si può esprimere il risultato se non come stima del numero di microrganismi presenti. Analogamente, al di sopra di un certo numero di colonie cresciute il risultato diventa via via meno preciso. Il numero totale di colonie sul filtro non deve essere superiore a 200, il numero delle colonie caratteristiche non deve essere superiore a 100. In conclusione il volume di campione analizzato, o di sue diluizioni, deve essere tale da permettere la crescita di un numero di colonie tipiche tra 10 e 100.

1) Per la valutazione della sensibilità è necessario creare una tabella nel modo seguente:

- a) numero delle colonie caratteristiche (presunte positive) risultate positive dopo identificazione (vere positive)
- b) numero delle colonie non caratteristiche (presunte negative) risultate positive dopo identificazione (false negative)
- c) numero delle colonie caratteristiche (presunte positive) risultate negative dopo identificazione (false positive)
- d) numero delle colonie non caratteristiche (presunte negative) risultate negative dopo identificazione (vere negative)

		Conteggi presuntivi		
		+	-	
Conteggi confermati	+	a	b	a + b
	-	c	d	c + d
		a + c	b + d	N



La verifica delle caratteristiche derivanti dalle osservazioni tabulate, viene calcolata come segue:

**Sensibilità** =  $a/(a+b)$ , frazione del totale dei positivi correttamente assegnati nel conteggio presuntivo.

**Specificità** =  $d/(c+d)$ , frazione del totale dei negativi correttamente assegnati nel conteggio presuntivo.

**Porzione di falsi positivi** =  $c/(a+c)$ , frazione dei positivi scorrettamente assegnati.

**Porzione di falsi negativi** =  $b/(b+d)$ , frazione dei negativi scorrettamente assegnati.

N = numero totale dei test eseguiti.  $(a+b+c+d)$

**Selettività (F)** =  $\lg [(a+c)/N]$ , logaritmo della frazione totale delle presunte colonie (o colture) target (presunte positive) sul totale, riferito allo schema precedente.

Per creare una tabella in grado di valutare i predetti dati statistici è necessario confermare tutte le colonie cresciute sulle piastre derivanti da un numero significativo di campioni rappresentativi di tutte le matrici comprese nel campo di applicazione del metodo, procedimento lungo e costoso che non è stato possibile effettuare durante il lavoro di tesi. Per questo motivo i dati sulla sensibilità, specificità, selettività e tasso di falsi positivi e negativi sono stati ricavati in due modi:

- per il metodo ISO 9308-1 del 2014 sono stati utilizzati i dati di performance presenti nell'articolo "*Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria*" presente sulla rivista Letters in Applied Microbiology;
- per i metodi APAT-CNR-IRSA 7010C/7030C sono stati utilizzati i dati ricavati nel corso della validazione dal laboratorio di microbiologia dell'ARPA Valle d'Aosta.

2) L'incertezza legata al conteggio viene valutata tramite lo studio della ripetibilità e della riproducibilità del conteggio degli operatori presenti nel laboratorio. Sono due stime dell'affidabilità dei risultati che è possibile ottenere con un metodo analitico. La ripetibilità (r) e la riproducibilità (R) vengono definite, in senso ampio, come segue:

ripetibilità: prossimità di accordo fra i risultati di misurazioni successive dello stesso campione, svolte nelle medesime condizioni

riproducibilità: prossimità di accordo fra i risultati di misurazioni consecutive dello stesso campione, svolte da diversi operatori.

Riguardo alla ripetibilità e alla riproducibilità del conteggio si deve calcolare la deviazione standard relativa che si può calcolare con le seguenti formule presenti nella ISO 13843:

- Se le conte sono effettuate in singolo si utilizza la formula:

$$RSD = \frac{s(x)}{\bar{x}}$$

dove  $\bar{x}$  è la media delle conte

$$s(x) = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$x_i$  numero di colonie contate sulla piastra considerata

$\bar{x}$  media tra le conte effettuate sulla piastra considerata

$n$  è il numero di conte effettuate per ogni piastra.

- Se le conte sono effettuate in doppio si utilizza la formula:

$$RSD = \frac{\sqrt{2} \times |x_1 - x_2|}{x_1 + x_2}$$

Dove  $x_1$  e  $x_2$  sono i valori delle conte per ogni piastra.

- Se il numero totale di campioni è inferiore ai 20 si utilizza la formula:

$$RSD = \sqrt{\frac{RSD1^2 + RSD2^2 + \dots}{n}}$$

Le predette formule possono essere utilizzate sia per la riproducibilità che per la ripetibilità.

3) L'indice di dispersione dei risultati rispetto a Poisson è utile per verificare l'accettabilità di una serie di risultati ottenuti da repliche della stessa diluizione svolte da uno stesso operatore. Per calcolare l'indice di dispersione si utilizza la formula presente nell'Annex A3 della ISO 13843:

$$\chi_{n-1}^2 = \frac{n \sum c_i^2 - (\sum c_i)^2}{\sum c_i}$$

dove  $c_i$  è una conta di una serie di conte parallele

$n$  è il numero di conte parallele

$\chi_{n-1}^2$  è l'indice di dispersione di Poisson

La sovradisersione può essere trovata riferendosi alla tabella della distribuzione del  $\chi^2$  con  $n-1$  gradi di libertà, confrontando tale valore con il valore calcolato tramite la formula riportata precedentemente.

4) La precisione è definita come il grado di concordanza tra i risultati di una serie di test ottenuti in specifiche condizioni (di ripetibilità). Nelle analisi microbiologiche le variazioni casuali dovute alla distribuzione casuale dei batteri nell'acqua è descritta dalla distribuzione di Poisson. Altre variazioni come il trattamento dei campioni, il tempo di analisi, l'utilizzo di reattivi di lotti differenti e la variazione nei tecnici che svolgono l'analisi, possono generare una situazione chiamata sovradisersione. Per rendere minime le variazioni legate al campione e all'operatore si effettuano prove parallele dello stesso campione svolte in un breve periodo. Le capsule Petri prodotte sono lette anche da due operatori diversi (per calcolare poi la riproducibilità del conteggio). Quantificare la sovradisersione in queste

condizioni è utile per descrivere la precisione dei test in analisi. La descrizione della precisione è stata effettuata tramite il calcolo dell'indice di dispersione di Poisson ( $\chi_{n-1}$ ), il calcolo dell'indice di sovradisersione ( $u$ ) applicando il metodo di Anscombe I (Anscombe 1950) e utilizzando l'approccio di regressione descritto dalla norma ISO 13843 sezione 6.2.3. (46)

### **3.5.2 ANALISI STATISTICA SEZIONE B**

Lo scopo è stato quello di valutare le prestazioni dei metodi in base alla ISO 16140, che prevede il confronto qualitativo tra un metodo alternativo ed uno di riferimento.

La valutazione dei risultati ottenuti dai diversi terreni di coltura sarà qualitativa (presenza-assenza) perché il grado di contaminazione delle acque soggette a controllo è minima o nulla. I campioni prelevati sono stati 281 e provengono da fonti d'acqua destinata all'uso umano come fontanili, sorgenti o rubinetti. Per ogni campione sono state effettuate tre filtrazioni consecutive per permettere la semina con il terreno previsto dal metodo ISO 9308-1 del 2014, con il metodo APAT-CNR-IRSA 7010C e con il metodo APAT-CNR-IRSA 7030C. L'importanza di riuscire a visualizzare, quando presenti, i batteri bersaglio è una caratteristica fondamentale per un terreno di coltura per questo è necessario calcolare il grado di accordo tra i risultati dei test per la ricerca di *E. coli* (metodo ISO 9308-1 del 2014 e metodo APAT-CNR-IRSA 7030C) e per la ricerca di batteri coliformi (metodo ISO 9308-1 del 2014 e metodo APAT-CNR-IRSA 7010C).

I parametri che devono essere valutati secondo la ISO 16140 sono:

**Sensibilità relativa (SE):** la probabilità che un campione “vero positivo” risulti effettivamente tale utilizzando il metodo in esame  $PA/N+ \times 100 \%$ .

**Specificità relativa (SP):** la probabilità che un campione “vero negativo” risulti effettivamente tale utilizzando il metodo in esame  $NA/N- \times 100\%$ .

**Esattezza relativa (AC):** Grado di concordanza tra il metodo di riferimento (e/o il valore di riferimento) ed il metodo in esame  $(PA+NA)/N \times 100\%$ .

Per calcolare i suddetti parametri è necessario suddividere i risultati ottenuti come segue:

$PA$  = accordo positivo

$NA$  = accordo negativo

$PD$  = deviazione positiva (risultato positivo con il metodo testato quando il “valore vero” è negativo)

$ND$  = deviazione negativa (risultato negativo con il metodo testato quando il “valore vero” è positivo)

$N$  = numero totale dei campioni ( $PA + NA + PD + ND$ )

$N+$  = numero totale dei campioni “veri positivi” ( $PA + ND$ )

$N-$  = numero totale dei campioni “veri negativi” ( $NA + PD$ )

Per calcolare tali parametri è necessario effettuare un numero minimo di prove pari a 10, comprensive di campioni positivi e negativi, relative alle tipologie di campioni normalmente analizzati.

Risultati ottenuti dal metodo di riferimento (o valore di riferimento) e metodo in esame:

Risposta	Metodo di riferimento positivo (R+)	Metodo di riferimento negativo (R-)
Metodo in esame positivo (r+)	Accordo positivo +/+ (PA)	Deviazione positiva -/+ (PD)
Metodo in esame negativo (r-)	Deviazione negativa +/- (ND)	Accordo negativo -/- (NA)

## RISULTATI

### 4.1.1 RISULTATI PARTE SPERIMENTALE A

Per valutare al meglio le prestazioni dei metodi in esame sono stati utilizzati campioni preparati in laboratorio con concentrazioni note di batteri bersaglio.

Il terreno previsto dal metodo APAT-CNR-IRSA 7010C è il C-EC agar e produce colonie caratteristiche verde-blu che rappresentano i batteri coliformi. Il terreno previsto dal metodo APAT-CNR-IRSA 7030C è lo stesso del metodo precedente però si valutano le colonie verde-blu che presentano fluorescenza alla luce ultravioletta che rappresentano le colonie di *E. coli*. Le colonie non caratteristiche si presentano in varie tonalità di giallo o bianco. Il terreno previsto dalla norma ISO 9308-1 del 2014 è il CCA e produce colonie caratteristiche rosa-rosse che rappresentano i batteri coliformi, le colonie di *E. coli* si presentano in diverse tonalità di blu-viola, mentre i batteri contaminanti quindi non caratteristici crescono di colori diversi da quelli sopra indicati.

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti dalle filtrazioni svolte in laboratorio rispetto ai terreni colturali considerati. Le tabelle riportano il numero di colonie caratteristiche contate in due diverse conte, svolte dal medesimo operatore in tempi diversi. I risultati ottenuti sono presentati divisi in base all'inoculo di partenza da cui sono state prelevate le aliquote per la filtrazione.

Inoculo 1 C-EC					
ino- culo	ope- ra- tore	APAT-CNR- IRSA 7010C	APAT-CNR- IRSA 7030C	APAT-CNR- IRSA 7010C	APAT-CNR- IRSA 7030C
		prima conta	prima conta	seconda conta	seconda conta
<b>1</b>	<b>A</b>	18	7	19	7
	<b>A</b>	22	12	22	12
	<b>A</b>	14	10	14	10
	<b>A</b>	12	7	12	8
	<b>A</b>	12	7	12	7
	<b>A</b>	12	5	12	5
	<b>A</b>	11	2	11	2
	<b>A</b>	10	6	10	6
	<b>A</b>	14	6	14	6
	<b>A</b>	18	2	18	2
<b>1</b>	<b>B</b>	19	7	19	7
	<b>B</b>	20	12	20	12
	<b>B</b>	13	10	13	10
	<b>B</b>	12	8	12	8
	<b>B</b>	12	7	12	7
	<b>B</b>	11	5	11	5
	<b>B</b>	10	2	10	2
	<b>B</b>	10	6	10	6
	<b>B</b>	14	7	14	7
	<b>B</b>	18	2	18	2

Inoculo 2 C-EC					
ino- culo	ope- ra- tore	APAT-CNR- IRSA 7010C	APAT-CNR- IRSA 7030C	APAT-CNR- IRSA 7010C	APAT-CNR- IRSA 7030C
		prima conta	prima conta	seconda conta	seconda conta
<b>2</b>	<b>A</b>	35	18	35	18
	<b>A</b>	28	20	27	19
	<b>A</b>	24	21	24	20
	<b>A</b>	23	14	23	13
	<b>A</b>	24	16	24	17
	<b>A</b>	27	15	26	14
	<b>A</b>	30	16	30	16
	<b>A</b>	25	18	26	18
	<b>A</b>	17	5	17	5
	<b>A</b>	24	13	25	13
<b>2</b>	<b>B</b>	35	18	35	18
	<b>B</b>	27	19	27	19
	<b>B</b>	24	21	24	21
	<b>B</b>	24	14	24	14
	<b>B</b>	24	16	24	16
	<b>B</b>	26	15	26	15
	<b>B</b>	30	16	30	16
	<b>B</b>	25	18	25	18
	<b>B</b>	17	5	17	5
	<b>B</b>	25	14	25	14



inoculo 1 CCA							
inoculo	operatore	colonie blu-viola	colonie Rosa-rosse	colonie blu-viola	colonie Rosa-rosse	colonie rosa-rosse ossidasi +	colonie rosa-rosse ossidasi -
		prima conta	prima conta	seconda conta	seconda conta		
<b>1</b>	<b>A</b>	11	4	11	4	0	4
	<b>A</b>	5	9	5	9	0	9
	<b>A</b>	6	14	6	14	0	14
	<b>A</b>	8	8	8	8	0	8
	<b>A</b>	5	9	5	8	0	8
	<b>A</b>	8	8	8	8	0	8
	<b>A</b>	9	6	9	6	0	6
	<b>A</b>	9	13	9	13	0	13
	<b>A</b>	9	7	9	7	1	6
	<b>A</b>	6	5	6	5	0	5
<b>1</b>	<b>B</b>	11	4	11	4	0	4
	<b>B</b>	5	9	5	9	0	9
	<b>B</b>	6	14	6	14	0	14
	<b>B</b>	8	8	8	8	0	8
	<b>B</b>	5	9	5	9	0	9
	<b>B</b>	8	8	8	8	0	8
	<b>B</b>	9	6	9	6	0	6
	<b>B</b>	9	13	9	13	0	13
	<b>B</b>	9	6	9	6	0	6
	<b>B</b>	6	5	6	5	1	4

Inoculo 2 CCA							
inoculo	operatore	colonie blu-viola	colonie rosa-rosse	colonie blu-viola	colonie rosa-rosse	colonie rosa-rosse ossidasi +	colonie rosa-rosse ossidasi -
		prima conta	prima conta	seconda conta	seconda conta		
<b>1</b>	<b>A</b>	12	5	12	6	0	5
	<b>A</b>	21	9	21	9	0	9
	<b>A</b>	15	17	15	17	1	16
	<b>A</b>	17	3	17	3	0	3
	<b>A</b>	21	10	21	10	0	10
	<b>A</b>	13	5	13	5	0	5
	<b>A</b>	18	8	18	8	0	8
	<b>A</b>	20	11	20	11	0	11
	<b>A</b>	19	11	19	11	0	11
	<b>A</b>	7	1	7	1	0	1
<b>1</b>	<b>B</b>	12	5	12	5	0	5
	<b>B</b>	21	9	21	9	0	9
	<b>B</b>	15	17	15	17	0	17
	<b>B</b>	17	3	17	3	0	3
	<b>B</b>	21	11	21	11	0	11
	<b>B</b>	13	5	13	5	0	5
	<b>B</b>	18	8	18	8	0	8
	<b>B</b>	20	11	20	11	0	11
	<b>B</b>	19	11	19	11	0	11
	<b>B</b>	7	1	7	1	0	1

#### **4.1.2 ELABORAZIONE DEI DATI PARTE A**

La valutazione della performance dei metodi è stata svolta seguendo le indicazioni riportate nella ISO 13843.

##### **1) Performance analitica**

Per valutare la sensibilità è necessario creare una tabella suddividendo le colonie in base alle caratteristiche rispetto ai terreni in analisi, come descritto nel paragrafo 3.5.1 “Analisi statistica sezione A” nel punto 1. Tramite la tabella è possibile valutare oltre alla sensibilità, la specificità e il tasso di falsi positivi e negativi. La tabella è applicabile solo in caso di conferma di un numero considerevole di colonie considerate, caratteristiche e non, operazione che richiede una mole di lavoro elevata sia sotto l'aspetto del tempo che dei costi e perciò non è stata effettuata in corso di tesi.

Per il metodo descritto dalla ISO 9308-1 del 2014 sono stati utilizzati i dati ricavati dall'articolo "Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria" presente sulla rivista Letters in Applied Microbiology che prende in considerazione la selezione casuale di 220 colonie sottoposte a conferma derivate da campioni di acque provenienti dal fiume Ruhr.

Per il metodo APAT-CNR-IRSA 7010C sono stati utilizzati i dati ottenuti da ARPA Valle d'Aosta su 22 colonie sottoposte a conferma derivate da campioni naturali, mentre per il metodo APAT-CNR-IRSA 7030C sono stati utilizzate 67 colonie presunte positive sottoposte a conferma da campioni di acque superficiali.

La tabella seguente riassume i dati di performance raccolti dalle diverse fonti, considerando che i dati presi dall'articolo per il metodo ISO 9308-1 sono più precisi in quanto svolti su un numero più elevato di campioni.

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%

Come si nota dalla tabella i dati presentati rispetto alla sensibilità, specificità, selettività e tasso di falsi positivi e negativi risulta molto simile tra i vari metodi nonostante il differente numero di colonie considerato.

## 2) Incertezza della conta

La ripetibilità e la riproducibilità assicurano l'assenza di errori sistematici durante l'analisi, inoltre garantiscono l'affidabilità tecnica a operare del personale. Le tabelle seguenti riassumono i risultati ottenuti dai test confrontandoli con il valore di riferimento della norma ISO 13843.

<b>Ripetibilità</b>			
terreno	batterio bersaglio	RSD	< 0,03
CCA ISO 9308-1 2014	<i>E. coli</i>	0,016	ok
CCA ISO 9308-1 2014	coliformi totali	0,013	ok
C-EC agar (7030C)	<i>E.coli</i>	0,033	limite
C-EC agar (7010C)	coliformi totali	0,020	ok

<b>Riproducibilità</b>			
<b>terreno</b>	<b>batterio bersaglio</b>	<b>RSD</b>	<b>&lt; 0,05</b>
<b>CCA ISO 9308-1 2014</b>	E. coli	0,015	ok
<b>CCA ISO 9308-1 2014</b>	coliformi totali	0,008	ok
<b>C-EC agar (7030C)</b>	E.coli	0,025	ok
<b>C-EC agar (7010C)</b>	coliformi totali	0,022	ok

Come presentato dalle tabelle tutti i valori sia di ripetibilità che di riproducibilità ottenuti sono al di sotto del limite previsto dalla norma, quindi possono considerarsi accettabili, tranne il valore di ripetibilità ottenuto con il metodo APAT e che riguarda la ricerca di *E. coli*.

### 3) Dispersione dei risultati secondo la distribuzione di Poisson

Applicando la formula riportata nel paragrafo 3.5.1 “Analisi statistica sezione A” punto 4 ai risultati prodotti dai campioni contaminati in laboratorio si è verificato che tutti i conteggi sono accettabili rispetto alla distribuzione di Poisson e non vi sono valori anomali di  $\chi^2$ . I valori di  $\chi^2$  sono stati calcolati tenendo conto dei risultati ottenuti da due operatori diversi, quindi un totale di 20 campioni per i due inoculi a diversa concentrazione batterica. La medesima operazione è stata svolta per tutte le metodiche in esame. Il valore di  $\chi^2$  tabulato è ottenuto ricercando il valore nella tabella della distribuzione del  $\chi^2$  utilizzando come coordinate i gradi di libertà che nei casi considerati sono 19 ad una probabilità del 95%

<b>Indice di dispersione di Poisson (ISO 13843)</b>				
<b>Terreno</b>	<b>batterio bersaglio</b>	<b>Inoculo</b>	<b><math>\chi^2</math> sperimentale</b>	<b><math>\chi^2</math> tabulato</b>
<b>CCA ISO 9308-1 2014</b>	E. coli	1	9,58	30,14
<b>CCA ISO 9308-1 2014</b>	E. coli	2	22,83	
<b>CCA ISO 9308-1 2014</b>	coliformi totali	1	11,01	
<b>CCA ISO 9308-1 2014</b>	coliformi totali	2	49,39	
<b>C-EC agar (7030C)</b>	E. coli	1	26,92	
<b>C-EC agar (7030C)</b>	E. coli	2	22,97	
<b>C-EC agar (7010C)</b>	coliformi totali	1	11,01	
<b>C-EC agar (7010C)</b>	coliformi totali	2	15,57	

L'unico valore che risulta non accettabile è il valore sperimentale della ISO 9308-1 2014 rispetto alla ricerca di batteri coliformi totali.

In questo caso una piastra ha dato come risultato un valore nettamente inferiore rispetto alla media degli altri risultati (8 batteri coliformi totali) e questo rende il test del  $\chi^2$  non accettabile rispetto ai valori tabulati. A parte il predetto dato anomalo gli altri valori sperimentali sono accettabili rispetto al  $\chi^2$  tabulato.

#### 4) Precisione

La precisione indica la concordanza tra i risultati di una serie analitica e si definisce con la lettera "u". Nella prima colonna sono presentati i risultati ottenuti con il metodo Anscombe I, che definisce la dispersione dei metodi rispetto alla distribuzione di Poisson, espressa come percentuale in eccesso

e in difetto. Nella seconda colonna vengono espressi i risultati con il metodo di regressione presentato nella ISO 13843 sezione 6.2.3, che presenta i dati come coefficiente di sovradisersione.

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

Rispetto all'articolo di riferimento "*Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria*" dalla rivista Letters in Applied Microbiology, è importante notare che sono stati valutati un numero minore di campioni, di conseguenza ogni scostamento nella lettura dei dati nell'esperimento effettuato provoca un innalzamento notevole dello scostamento dei dati sia rispetto a Poisson che rispetto all'approccio con la regressione lineare, anche se di fatto gli scostamenti tra le letture sono minimi. In particolare i risultati ottenuti posso definirsi accettabili, tranne che per la sovradisersione  $u$  secondo la ISO 13843 rispetto ai batteri coliformi con Metodo ISO 9308-1 del 2014. In questo caso una filtrazione ha dato una conta più bassa rispetto alla media delle altre filtrazioni (conta di 8 batteri coliformi). Questo valore, abbinato al fatto di avere poche sessioni di prove (solamente due) fa innalzare il fattore  $K$  (che rappresenta il rapporto tra la varianza relativa alla conta e la media delle conte, definito come  $K = \frac{s^2}{m}$ ) che rende maggiore la sovradisersione calcolata rispetto alla regressione lineare. Lo stesso ragionamento è da adottare per il calcolo di  $u$  con la regressione lineare per *E. coli* sul terreno CCA, infatti la stessa conta è nettamente più bassa rispetto alla media della

altre, di conseguenza la sovradisersione si innalza rendendo poco attendibile il dato finale rispetto al caso specifico.

#### 4.2.1 RISULTATI PARTE SPERIMENTALE B

I dati provengono da 281 campioni di routine del laboratorio di microbiologia dell'Arpa Valle d'Aosta, che sono stati filtrati due volte per ogni esperimento in modo da produrre un numero sufficiente di membrane da porre sui terreni di coltura. Di seguito è riportata la tabella riassuntiva dei risultati ottenuti rispetto alla ricerca di *E. coli* e rispetto alla ricerca di batteri coliformi totali.

<b>Risultati <i>E. coli</i></b>	<b>APAT-CNR-IRSA 7030 C</b>	<b>ISO 9308-1 2014</b>	<b>totale</b>
<b>positivo</b>	22	19	41
<b>negativo</b>	259	262	521
<b>totale</b>	281	281	562

<b>Risultati batteri coliformi totali</b>	<b>APAT-CNR-IRSA 7010 C</b>	<b>ISO 9308-1 2014</b>	<b>totale</b>
<b>positivo</b>	111	112	223
<b>negativo</b>	170	169	339
<b>totale</b>	281	281	562



#### 4.2.2 ELABORAZIONE DEI DATI PARTE B

I dati sono stati ordinati come descritto nel paragrafo 3.5.2 “Analisi statistica sezione B” in accordo alla ISO 16140 capitolo 5

- Per la ricerca di E. coli sono stati considerati i risultati del metodo ISO 9308-1 del 2014 e del metodo APAT-CNR-IRSA 7030C.

<b>Risposta- E coli</b>	<b>ISO 9308-1 2014 +</b>	<b>ISO 9308-1 2014 -</b>
<b>APAT-CNR-IRSA 7030 C +</b>	19 ++ (PA)	3 -/+ (PD)
<b>APAT-CNR-IRSA 7030 C -</b>	0 +/- (ND)	259 -/- (NA)

#### **Sensibilità relativa (SE) APAT-CNR-IRSA 7030 C:**

$$(PA/N+) \times 100 \% = (19/22) \times 100 = 86\%$$

#### **Specificità relativa (SP) APAT-CNR-IRSA 7030 C:**

$$(NA/N-) \times 100 \% = (259/259) \times 100 = 100\%$$

#### **Sensibilità relativa (SE) ISO 9308-1 2014:**

$$(PA/N+) \times 100 \% = (19/19) \times 100 = 100\%$$

#### **Specificità relativa (SP) ISO 9308-1 2014:**

$$(NA/N-) \times 100 \% = (259/262) \times 100 = 98,9\%$$

#### **Esattezza relativa (AC):**

$$[(PA+NA)/N] \times 100 \% = [(19+259)/281] \times 100 = 98,9\%$$

- Per la ricerca dei batteri coliformi totali sono stati considerati i dati del metodo ISO 9308-1 del 2014 e del metodo APAT-CNR-IRSA 7010C.

<b>Risposta- coliformi totali</b>	<b>ISO 9308-1 2014 +</b>	<b>ISO 9308-1 2014 -</b>
<b>APAT-CNR-IRSA 7010 C +</b>	111 +/+ (PA)	0 -/+ (PD)
<b>APAT-CNR-IRSA 7010 C -</b>	1 +/- (ND)	169 -/- (NA)

**Sensibilità relativa (SE) APAT-CNR-IRSA 7010 C:**

$$(PA/N+) \times 100 \% = (111/111) \times 100 = 100\%$$

**Specificità relativa (SP) APAT-CNR-IRSA 7010 C:**

$$(NA/N-) \times 100 \% = (169/170) \times 100 = 99\%$$

**Sensibilità relativa (SE) ISO 9308-1 2014:**

$$(PA/N+) \times 100 \% = (111/112) \times 100 = 99\%$$

**Specificità relativa (SP) ISO 9308-1 2014:**

$$(NA/N-) \times 100 \% = (169/169) \times 100 = 100\%$$

**Esattezza relativa (AC):**

$$[(PA+NA)/N] \times 100 \% = [(111+169)/281] \times 100 = 99,6\%$$

Dal punto di vista qualitativo si può quindi dire alla luce dei calcoli svolti precedentemente, che i metodi in esame hanno prestazioni elevate e anche il valore di esattezza ottenuto, ovvero la concordanza tra i metodi che rilevano *E. coli* e i batteri coliformi, risulta essere ottimo.

## CONCLUSIONI

Il lavoro ha lo scopo di confrontare la metodica ISO 9308-1 del 2014 con la metodica APAT IRSA CNR 7010C del 2003 rispetto ai batteri coliformi totali e con la metodica APAT IRSA CNR 7030C del 2003 rispetto al batterio *Escherichia coli*, al fine di valutare la metodica più adatta sulla base di dati statistici e sulla base della praticità di utilizzo rispetto alle esigenze operative dell'ARPA Valle d'Aosta.

I campioni contaminati artificialmente in laboratorio hanno prodotto risultati quantitativi che risultano essere utili a valutare l'efficienza dei test in base allo studio della performance analitica.

Una tabella riassuntiva è riportata di seguito:

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

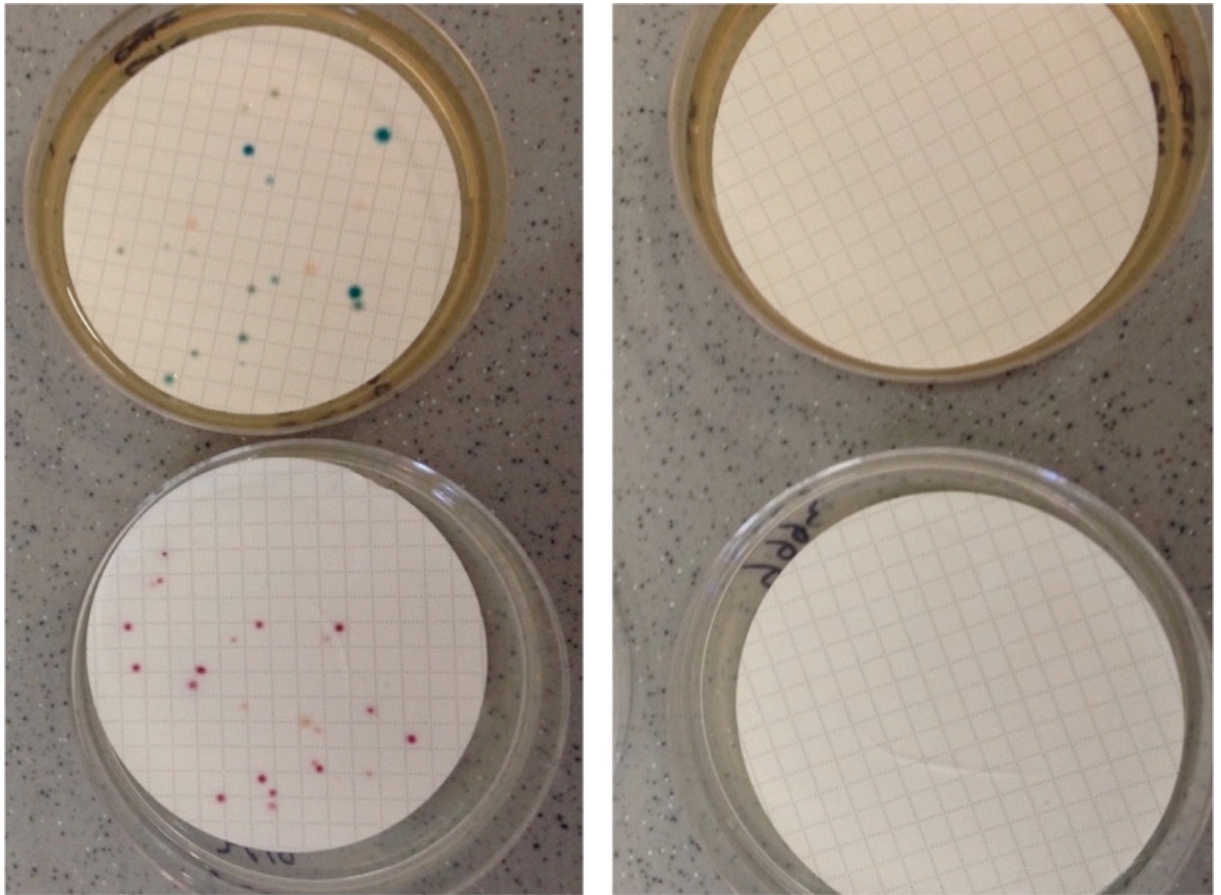
Dai risultati ottenuti si può notare che tutti i gli indici di performance sono ottimi e superano il limite minimo imposto dalla norma ISO 13843, segno che le differenze tra le metodiche sono poco rilevanti dal punto di vista statistico.

I metodi microbiologici però non possono essere valutati solo dal punto di vista statistico, in quanto la componente legata all'operatore e alle specifiche dei terreni sono rilevanti, inoltre ricercando organismi viventi è necessario tener conto delle variazioni casuali ad ogni analisi.

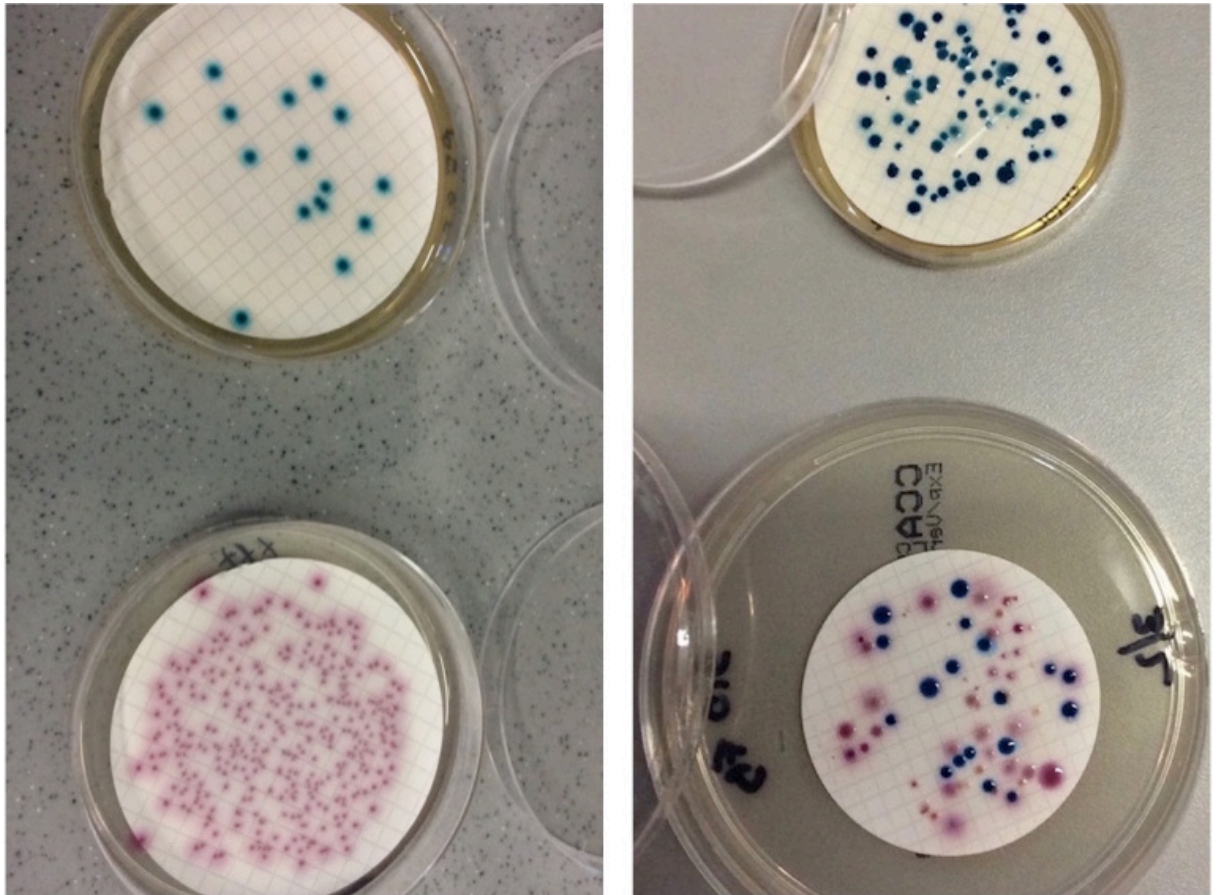
I tempi di risposta sono simili in quanto permettono di dare un responso nell'arco delle 24 ore dall'inizio dell'analisi. Anche le prove di conferma dei metodi sono rapide, infatti sia la lettura tramite lampada di Wood per visualizzare le colonie fluorescenti nel metodo APAT-CNR-IRSA 7030 C che le prove dell'ossidasi per le colonie rosa-rosse nel metodo ISO 9308-1 del 2014 sono prove rapide e semplici da svolgere.

Un fattore non trascurabile per valutare un metodo è la semplicità e l'immediatezza con la quale un operatore riesce a discriminare e valutare le colonie target di un determinato terreno di coltura. Il terreno previsto dai metodi APAT-CNR-IRSA 7010C/7030C è il medesimo e visualizza le colonie di *Enterobacteriaceae* in blu-verde (*E. coli* è anche fluorescente), mentre nel metodo ISO 9308-1 del 2014 le colonie di enterobatteri sono visualizzate in rosa-rosso e quelle di *E. coli* si presentano come blu-viola.

Nella coppia di immagini presentate di seguito si può notare come si presentano le piastre di C-EC (in alto) e di CCA (in basso) in caso di contaminazioni basse o nulle tipiche dei campioni di acqua destinata al consumo umano.



Nella serie di immagini seguenti vengono presentate delle piastre di C-EC (in alto) e CCA (in basso) contaminate con acque superficiali che possiedono una carica batterica più elevata rispetto alle acque destinate al consumo umano. Si può notare come entrambe le piastre non siano adatte all'analisi a causa delle elevate concentrazioni batteriche, infatti il conteggio delle colonie in questi casi risulta difficoltoso.



Per discriminare *E. coli* il terreno CCA è più intuitivo e diretto, mentre per visualizzare i batteri coliformi totali i due metodi risultano essere pressoché identici, anche se spesso le piastre di CCA permettono la crescita di un numero elevato di falsi positivi rispetto ai batteri coliformi che verranno individuati solo con la successiva prova dell'ossidasi. Questo aspetto vale solo nel caso in cui le acque analizzate siano poco contaminate, poiché a contaminazioni elevate le diverse metodiche risultano poco efficaci, perché al momento della lettura risulta impossibile distinguere le colonie e quindi contarle, infatti il campo di lavoro ideale presuppone che il numero totale di colonie target sia  $<100$ , e il numero di colonie totale sia  $<200$ .

Altro aspetto da notare è che la metodica prevista dalla ISO 9308-1 del 2014 per la ricerca di *E. coli* e batteri coliformi viene effettuata utilizzando la medesima capsula Petri, mentre per i metodi APAT-CNR-IRSA pur uti-

lizzando lo stesso terreno di coltura, la ricerca di batteri richiede due differenti temperature di incubazione e quindi anche due diverse capsule Petri. Questo fa sì che utilizzando il metodo ISO 9308-1 del 2014 si abbia una riduzione dei costi dei materiali in quanto si utilizzano un numero inferiore di piastre e anche una minor mole di lavoro per gli operatori che svolgono le analisi, con conseguente diminuzione del tempo di analisi.

Valutando in modo qualitativo le metodiche è stato possibile, oltre che valutare la performance dei terreni, verificare la concordanza tra i risultati ottenuti dai test rispetto al batterio target. Questo risulta utile per capire se una metodica è migliore dell'altra sulla base della risposta che danno rispetto allo stesso campione. Valutando un numero adeguato di campioni di routine è possibile affermare che le metodiche danno risultati simili rispetto al batterio target (*E. coli* e batteri coliformi totali).

Sulla base delle evidenze scientifiche e statistiche descritte in precedenza e tenendo conto delle peculiarità pratiche e organizzative relative alla realtà laboratoristica in cui è stato svolto lo studio la metodica ISO 9308-1 del 2014 è sostenibile e sovrapponibile alle metodiche utilizzate in precedenza per la ricerca di *E. coli* e batteri coliformi totali e, inoltre, alle metodiche APAT-CNR-IRSA 7010C/7030C, presenta diversi punti di forza sotto l'aspetto dei costi e del tempo di analisi dei campioni.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Rossella BRIANCESCO; Ann Ist Super Sanità 2005;41(3):353-358. “Indicatori microbiologici e valutazione della qualità delle acque superficiali”.
- (2) Notiziario ISS, Volume 20 - Numero 5 maggio 2007. “LA GIORNATA MONDIALE DELL’ACQUA : FRONTEGGIARE LA SCARSITÀ D’ACQUA”
- (3) D. Lgs. 2 febbraio 2001, n. 31, art. 6-7-8“Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano”
- (4) EFSA Journal 2015;13(1):3991; “The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013”.
- (5) Notiziario ISS, Volume 20 - Numero 5 maggio 2007. “LA GIORNATA MONDIALE DELL’ACQUA : FRONTEGGIARE LA SCARSITÀ D’ACQUA”
- (6) World health Organization 2014; “Proportion of population using improved drinking water sources in 2012”
- (7): World health Organization 2014; “Countries reporting cholera deaths in 2012”



- (8) Rossella BRIANCESCO; Ann Ist Super Sanità 2005;41(3):353-358.  
“Indicatori microbiologici e valutazione della qualità delle acque superficiali”.
- (9) Dipartimento di Ambiente e Connessa prevenzione primaria, “Metodi analitici ufficiali per le acque destinate al consumo umano ai sensi del D.lg. 31/2001”, determinazione di *Clostridium perfringens*, p 48
- (10) D.lgs. 2 febbraio 2001, n. 31 parte A “Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano”
- (11) Dipartimento di Ambiente e Connessa prevenzione primaria, “Metodi analitici ufficiali per le acque destinate al consumo umano ai sensi del D.lg. 31/2001”, determinazione di *Pseudomonas aeruginosa*, p 37
- (12) D. Lgs. 2 febbraio 2001, n. 31 parte C “Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano”
- (13) Rossella BRIANCESCO; Ann Ist Super Sanità 2005;41(3):353-358.  
“Indicatori microbiologici e valutazione della qualità delle acque superficiali”.
- (14) Rossella BRIANCESCO; Ann Ist Super Sanità 2005;41(3):353-358.  
“Indicatori microbiologici e valutazione della qualità delle acque superficiali”.
- (15) Michele La Placa “Principi di microbiologia medica” decima edizione, Bologna, capitolo 21 “Enterobatteri”

Patrick R. Murray “microbiologia medica” sesta edizione, Elsevier editore,  
capitolo 30 “Enterobacteriaceae”

(16) Michele La Placa “Principi di microbiologia medica” decima edizione,  
Bologna, capitolo 21 “Enterobatteri, Escherichia”

Patrick R. Murray “microbiologia medica” sesta edizione, Elsevier editore,  
capitolo 30 “Enterobacteriaceae, Escherichia coli”

Sito: Centers for Disease Control and Prevention; *E. coli* homepage

(17) Michele La Placa “Principi di microbiologia medica” decima edizione,  
Bologna, capitolo 21 “Enterobatteri, Shigelle”

Patrick R. Murray “microbiologia medica” sesta edizione, Elsevier editore,  
capitolo 30 “Enterobacteriaceae, Shigelle”

(18) Michele La Placa “Principi di microbiologia medica” decima edizione,  
Bologna, capitolo 21 “Enterobatteri, Salmonelle”

Patrick R. Murray “microbiologia medica” sesta edizione, Elsevier editore,  
capitolo 30 “Enterobacteriaceae, Salmonelle”

(19) Michele La Placa “Principi di microbiologia medica” decima edizione,  
Bologna, capitolo 21 “Enterobatteri, Klebsielle”

Patrick R. Murray “microbiologia medica” sesta edizione, Elsevier editore,  
capitolo 30 “Enterobacteriaceae, Klebsielle”

(20) Michele La Placa “Principi di microbiologia medica” decima edizione,  
Bologna, capitolo 21 “Enterobatteri, Yersinia”

Patrick R. Murray “microbiologia medica” sesta edizione, Elsevier editore,  
capitolo 30 “Enterobacteriaceae, Yersinia”

(21) Michele La Placa “Principi di microbiologia medica” decima edizione, Bologna, capitolo 21 “Enterobatteri, Enterobacter”

Patrick R. Murray “microbiologia medica” sesta edizione, Elsevier editore, capitolo 30 “Enterobacteriaceae, Enterobacter”

(22) Michele La Placa “Principi di microbiologia medica” decima edizione, Bologna, capitolo 21 “Enterobatteri, Serratia”

Patrick R. Murray “microbiologia medica” sesta edizione, Elsevier editore, capitolo 30 “Enterobacteriaceae, Serratia”

(23) Michele La Placa “Principi di microbiologia medica” decima edizione, Bologna, capitolo 21 “Enterobatteri, Proteus”

Patrick R. Murray “microbiologia medica” sesta edizione, Elsevier editore, capitolo 30 “Enterobacteriaceae, Proteus”

(24) Rapporto ISTISAN 05/xx “determinazione dei batteri coliformi a 37°C”

H. Leclere, traduzione di Carlo Francalanci e Enrico Papini, “Indicatori batteriologici e controllo di qualità delle acque minerali naturali”, biologia ambientale n° 6/1997

(25) Michele La Placa “Principi di microbiologia medica” decima edizione, Bologna, capitolo 22 “Vibrioni e batteri affini”

Patrick R. Murray “microbiologia medica” sesta edizione, Elsevier editore, capitolo 31 “Vibrio e Aeromonas”

(26) Michele La Placa “Principi di microbiologia medica” decima edizione, Bologna, capitolo 33 “I batteri anaerobi obbligati”

Patrick R. Murray “microbiologia medica” sesta edizione, Elsevier editore, capitolo 39 “Clostridium”

Sito: Epicentro, Il portale dell’epidemiologia per la sanità pubblica a cura del centro nazionale di epidemiologia, sorveglianza e promozione della salute; tetano.

(27) Michele La Placa “Principi di microbiologia medica” decima edizione, Bologna, capitolo 29 “Pseudomonas aeruginosa e batteri correlati”

Patrick R. Murray “microbiologia medica” sesta edizione, Elsevier editore, capitolo 33 “Pseudomonas aeruginosa e batteri correlati”

(28) Patrick R. Murray “microbiologia medica” sesta edizione, Elsevier editore, capitolo 61 “Rovirus, rotavirus”

Sito: Epicentro, Il portale dell’epidemiologia per la sanità pubblica a cura del centro nazionale di epidemiologia, sorveglianza e promozione della salute; *rotavirus*

(29) D. Lgs. 2 febbraio 2001, n. 31 parte A “Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano”

(30) ISO/IEC 17011:2005; “Évaluation de la conformité — Exigences générales pour les organismes d'accréditation procédant à l'accréditation des organismes d'évaluation de la conformité”.

(31) Sito: Arpa Emilia Romagna; Ferrara; qualità e certificazioni

(32) UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005; “Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura”.

(33) ACCREDIA, l'ente italiano di accreditamento; RT-08 Rev. 02:  
“Prescrizioni per l'accreditamento dei laboratori di prova”.

(34) Sito: Istituto superiore per la protezione e la ricerca ambientale: manuale con titolo “criticità nel percorso di accreditamento dei saggi ecotossicologici” del 2015

Sito: ARPA Emilia Romagna – ARPA Marche Giornata di formazione Bologna 25 novembre 2004: “La validazione dei metodi microbiologici: aspetti applicativi, controllo del processo analitico e valutazione dell'operatore”.

(35) UNI ENV ISO 13843:2003:” Qualità dell'acqua. Guida per la validazione di metodi microbiologici”.

(36) UNI EN ISO 19458:2006; “Water quality -- Sampling for microbiological analysis”.

(37) EN 25667-1 :1994 ; “Water quality. Sampling. Guidance on the design of sampling programmes”

(38) ISO 7704 : 1985 ; “Water quality -- Evaluation of membrane filters used for microbiological analysis”.

(39) ISO 8199 :2005 ; “Water quality -- General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture”.

(40) ISO 11113: 2014; “Microbiology of food, animal feed and water -- Preparation, production, storage and performance testing of culture media”.

(41) APAT CNR IRSA met.7030C Man. 29 2003

(42) APAT CNR IRSA 7010C Man 29 2003

(43) ISO 9308-1:2014; Water quality -- Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria -- Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora

(44) ISO 16140:2003; “Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Protocol for the validation of alternative methods”.

(45) B. Lange, M. Strathmann e R. Oßmer, "Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria”, Letters in Applied Microbiology, ISSN 0266-8254, December 2013 Volume 57, Issue 6 p 547-553

(46) Anscombe, F. J. (1950). Sampling theory of the negative binomial and logarithmic series distributions. *Biometrika*, 37, 358–382.

UNI ENV ISO 13843:2003:” Qualità dell’acqua. Guida per la validazione di metodi microbiologici”, sezione 6.2.3.