



UNIVERSITA' DEL SALENTO
FACOLTA' DI SCIENZE MM. FF. NN.
CORSO DI LAUREA IN SCIENZE BIOLOGICHE

TESI DI LAUREA IN IGIENE

Calcolo dell'incertezza di misura nelle analisi microbiologiche delle acque destinate al consumo umano

Relatori:

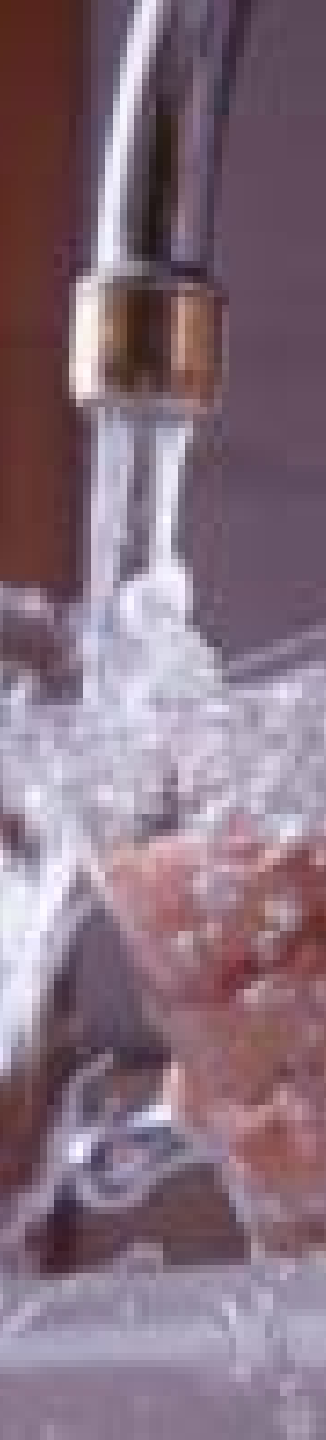
Prof. Marcello GUIDO

Correlatori:

Dott.ssa Lucia Rita STANCA
Dott. Francesco BAGORDO

Laureando:

Arcangelo DE PASCALIS

A vertical photograph of a water tap with water flowing out, positioned on the left side of the slide. The tap is metallic and the water is clear and aerated.

Controllo microbiologico delle acque destinate al consumo umano

Il controllo microbiologico delle acque ha lo scopo di accertare che essa non sia veicolo di trasmissione di microrganismi patogeni, come virus e batteri, eliminati con le feci.

Per verificare il rischio reale di contrarre una malattia infettiva ad interessamento gastrointestinale in seguito al consumo diretto di acqua o al consumo di alimenti venuti a contatto con acque contaminate, bisognerebbe ricercare tutti i germi potenzialmente patogeni.

Microrganismi indicatori

A causa delle difficoltà relative alla ricerca dei patogeni per valutare il rischio infettivo degli ambienti idrici viene stimata l'eventuale presenza di indicatori di contaminazione fecale.

Questi presentano come habitat naturale il tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo e vengono emessi all'esterno tramite le feci.

Il D. Lgs. 31/01 prevede per il controllo microbiologico minimo la ricerca di carica batterica totale a 22° e 36°C, Coliformi totali, *Escherichia coli* ed Enterococchi.

Microrganismi indicatori

INDICATORI	SIGNIFICATO
Coliformi totali	Non possono essere considerati indicatori di contaminazione di sicura origine fecale, possono essere comunque utili come indicatori dell'efficienza dei trattamenti di depurazione delle acque e dell'integrità delle reti idriche
<i>E. coli</i>	Indica che nell'acqua vi è stato un inquinamento fecale e/o che gli interventi di potabilizzazione e di disinfezione non sono stati sufficienti a rimuovere la contaminazione
Enterococchi	Rappresentano dei buoni indicatori di contaminazione fecale e, avendo una resistenza al cloro del tutto simile a quella degli enterovirus, possono fornire informazioni sulla loro possibile presenza nelle acque in esame
Carica batterica a 22° e 36°C	Rappresenta la biomassa microbica vitale rilevabile su uno specifico substrato

Letture dei risultati e incertezza

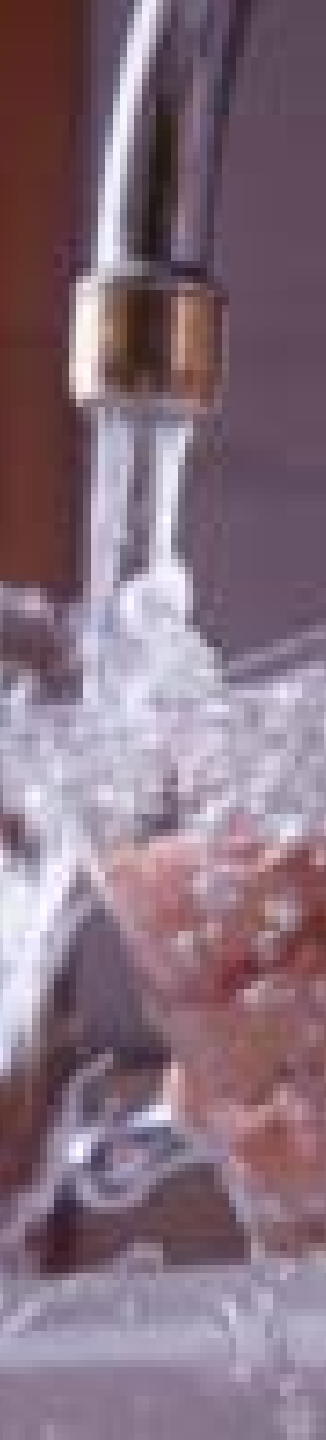
Lo svolgimento di analisi microbiologiche è soggetto a condizioni di variabilità che possono derivare da fattori interni che esterni.

Ogni tipo di fattore, singolarmente, in sinergia o in antagonismo, può concorrere alla variabilità complessiva del risultato.

La sua influenza deve essere tenuta sotto controllo valutando il livello del suo contributo all'incertezza generale del risultato rispetto al livello di probabilità ritenuto accettabile.

In microbiologia l'incertezza da associare al risultato, nel caso di utilizzo della tecnica di semina su piastra, è generalmente espressa come intervallo di fiducia ad un livello di probabilità del 95 % ($p=0,95$).

SCOPO DELLA TESI

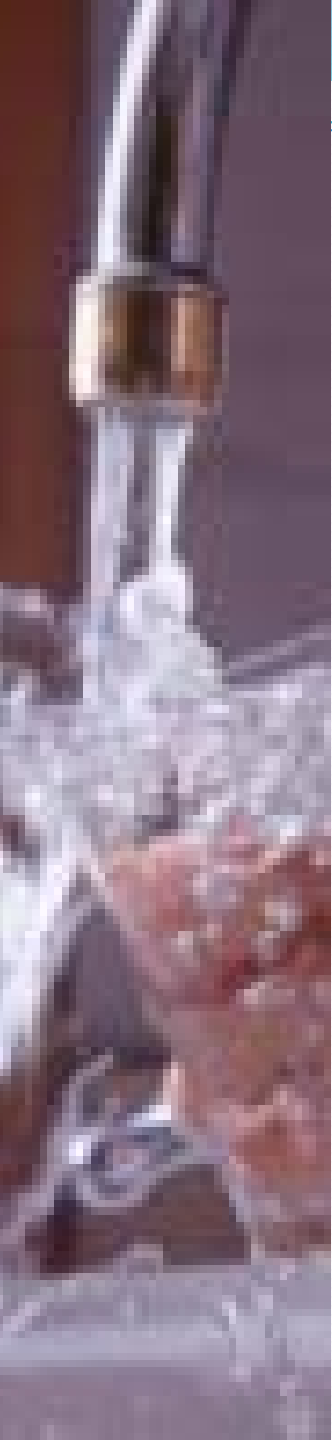
- 
- ▶ Analizzare campioni d'acqua contaminati in laboratorio per la determinazione delle colonie a 22 e 36°C, dei coliformi totali, di *Escherichia coli* e degli enterococchi.
 - ▶ Effettuare l'analisi statistica dei risultati ottenuti al fine di valutare l'incertezza estesa associata alla singola prova e relativo metodo.

MATERIALI E METODI

Fase preanalitica

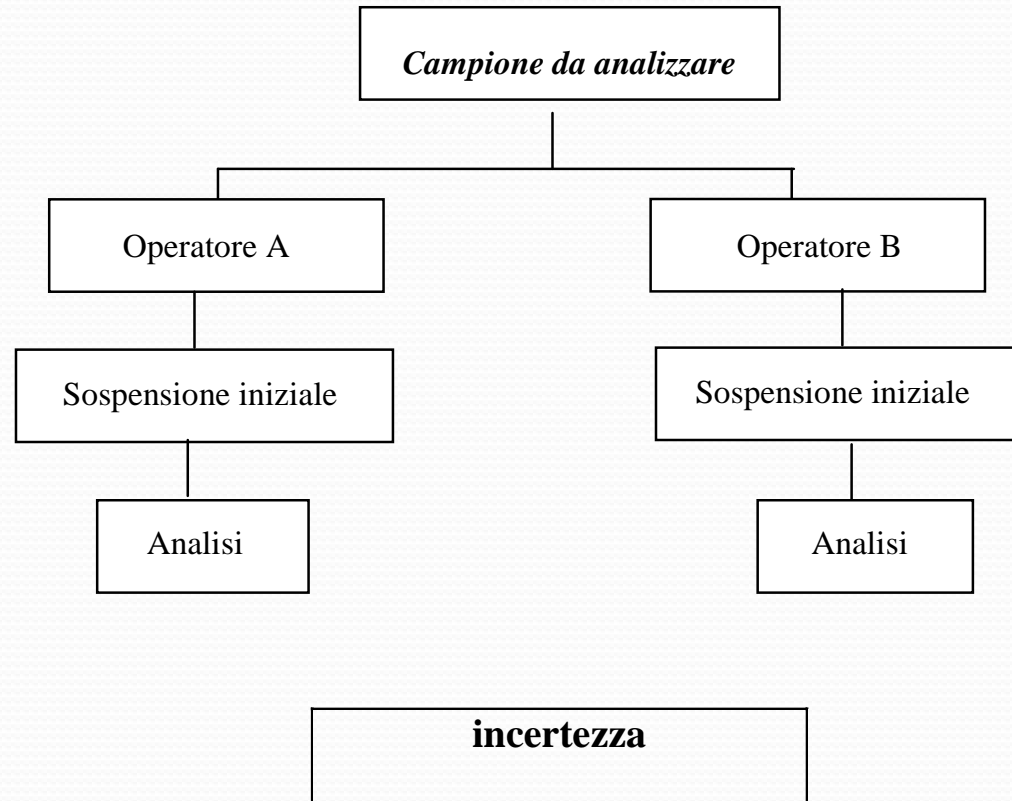
Preliminarmente è stata eseguita la preparazione dei campioni da sottoporre ad analisi microbiologica.

Campioni d'acqua di provenienza ambientale sono stati dapprima sterilizzati in autoclave e quindi contaminati sperimentalmente con E. coli, Enterococchi e coliformi totali mediante prelievo e successiva sospensione di aliquote prelevate da colture pure.



MATERIALI E METODI

Figura 1 : Protocollo di Analisi



In accordo con la norma, per ciascun microrganismo (o gruppo di microrganismi) e per metodo sono state eseguite 10 misure da parte di due operatori indipendenti (A e B) in un arco di tempo abbastanza ampio secondo lo schema riportato in figura 1.

Conta delle colonie a 22°C e 36°C

Metodo: inclusione

Terreno: agar

all'estratto di lievito

Incubazione:

- 22°C per 72 ore
- 36°C per 48 ore





Coliformi totali

Metodo: filtrazione

Terreno: m-Endo agar

Incubazione: 36°C
per 18-24 ore

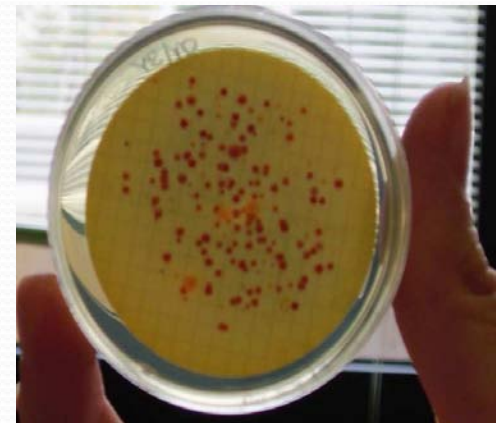


Escherichia coli

Metodo: filtrazione

Terreno: TTC

Incubazione: 36°C
per 18-24 ore

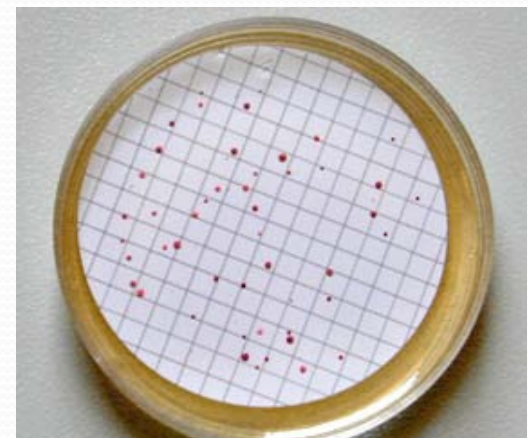


Enterococchi

Metodo: filtrazione

Terreno: Slanetz bartley

Incubazione: 36°C
per 40-48 ore



Calcolo dell'incertezza

Espressione dei risultati

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot 1,1 \cdot d}$$

Si prendono in considerazione due diluizioni successive e significative, ossia che contengano almeno 10 colonie e non più di 300 (ISO 7218:2007)

Scarto tipo di riproducibilità (s_R)

$$s_R = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{(y_{iA} - y_{iB})^2}{2}}$$

Incertezza estesa

$$U = 2 \sqrt{s_R^2 + \frac{0.18861}{\sum C}}$$

Per conte basse ed elevate

$$U = 2s_R$$

Per conte elevate

RISULTATI

CBT a 22°C e a 36°C

N°	Oper	Prima diluizione utile	CBT a 22°C UFC/g-ml	CBT a 36°C UFC/g-ml
1	A	3	2,5E+05	1,2E+05
	B	3	1,7E+05	1,5E+05
2	A	3	9,1E+04	8,0E+04
	B	3	1,5E+05	1,4E+05
3	A	2	1,2E+04	9,5E+03
	B	2	1,3E+04	1,2E+04
4	A	3	1,8E+05	1,2E+05
	B	3	1,5E+05	1,5E+05
5	A	1	8,9E+02	8,3E+02
	B	1	4,3E+02	4,7E+02
6	A	1	9,5E+02	9,1E+02
	B	1	7,6E+02	7,1E+02
7	A	2	1,2E+04	1,1E+04
	B	2	9,9E+03	9,5E+03
8	A	3	1,5E+05	1,4E+05
	B	3	1,7E+05	1,7E+05
9	A	1	7,5E+02	5,7E+02
	B	1	4,3E+02	4,2E+02
10	A	3	8,2E+04	8,0E+04
	B	3	9,2E+04	9,2E+04

RISULTATI

CT, *E. coli* ed Enterococchi

N°	Oper	Prima diluizione utile	CT UFC/100 ml	<i>E. coli</i> UFC/100 ml	Enterococchi UFC/100 ml
1	A	tal quale	5,3E+01	5,7E+01	3,7E+01
	B	"	4,5E+01	4,1E+01	3,0E+01
2	A	"	3,5E+01	3,9E+01	2,4E+01
	B	"	3,9E+01	3,7E+01	1,9E+01
3	A	"	6,9E+01	6,6E+01	4,5E+01
	B	"	6,8E+01	6,0E+01	4,2E+01
4	A	"	6,3E+01	6,9E+01	5,3E+01
	B	"	1,0E+02	9,1E+01	8,6E+01
5	A	"	5,8E+01	6,5E+01	6,2E+01
	B	"	4,7E+01	4,6E+01	4,3E+01
6	A	"	9,1E+01	7,7E+01	7,2E+01
	B	"	7,1E+01	7,2E+01	6,7E+01
7	A	"	5,2E+01	5,0E+01	4,7E+01
	B	"	9,5E+01	7,1E+01	6,9E+01
8	A	"	1,4E+02	8,2E+01	6,4E+01
	B	"	1,0E+02	5,3E+01	5,4E+01
9	A	"	5,7E+01	5,5E+01	6,3E+01
	B	"	4,2E+01	4,3E+01	4,2E+01
10	A	"	6,4E+01	6,7E+01	6,1E+01
	B	"	7,2E+01	4,4E+01	3,8E+01

RISULTATI

Calcolo dell'incertezza

Prova	Scarto tipo di riproducibilità S_R	Incertezza estesa Log U
<i>CBT a 22 °C</i>	0,12	$\pm 0,23$
<i>CBT a 36 °C</i>	0,10	$\pm 0,20$
<i>Coliformi Totali</i>	0,09	$\pm 0,19$
<i>Escherichia coli</i>	0,09	$\pm 0,18$
<i>Enterococchi</i>	0,10	$\pm 0,20$

Tabella : risultati relativi al calcolo dello scarto di riproducibilità intralaboratorio (S_R) dal quale poi si ricava l'incertezza (U).

CONCLUSIONI

Là dove sono coinvolte la salute e la sicurezza pubblica, è necessario dare una valutazione oggettiva del risultato ottenuto dalla quale si possa ricavare quantitativamente il livello di qualità del servizio offerto.

Un metodo per effettuare tali valutazioni è dato dal calcolo dell'incertezza. Essa definisce un intervallo intorno al risultato entro cui ci si aspetta sia compresa gran parte dei valori che possono essere ragionevolmente attribuiti al misurando.

I risultati ottenuti in questo lavoro indicano che il grado di incertezza misurato per le prove relative alla ricerca dei parametri CBT 22°C, CBT 36°C, Coliformi Totali, *E. coli* ed Enterococchi sono nel complesso soddisfacenti.

Al fine di mantenere standard qualitativi elevati e di raggiungere livelli valutativi migliori occorre, tuttavia, tenere sotto controllo i punti critici insiti nelle procedure applicate ed eventualmente superarli attraverso un costante aggiornamento delle stesse (terreni di coltura, strumentazione, personale, ecc.).

**Calcolo dell'incertezza di misura nelle
analisi microbiologiche delle acque
destinate al consumo umano**

Grazie

De Pascalis Arcangelo

