

Laboratorio

LA RIVISTA DEL RICERCATORE CHIMICO E BIOLOGICO

2000

INCHIESTA
ADDITIVI ALIMENTARI:
NOVITÀ DELLA UE

BIORESTAURO
NUOVE FRONTIERE
APPLICATE ALL'ARTE

ANALISI E INDAGINI
RICERCHE SCIENTIFICHE
DEI RIS

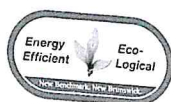
SPECIALE BIOINFORMATICA
NUOVE METODICHE
E SPERIMENTAZIONI

eppendorf

Conosciuti da decenni come i più affidabili, i congelatori New Brunswick ora sono anche ad alta efficienza energetica

Freezers HEF[®] – the Eco-Logical Choice[™]

Congelatori con l'uso della coibentazione sotto vuoto e refrigeranti CFC-free e HFC-free



www.eppendorf.it

Eppendorf S.r.l.
Via Zante, 14 - 20138 Milano
Tel. 02 55 404 1
Fax 02 5801 34 38
eppendorf@eppendorf.it

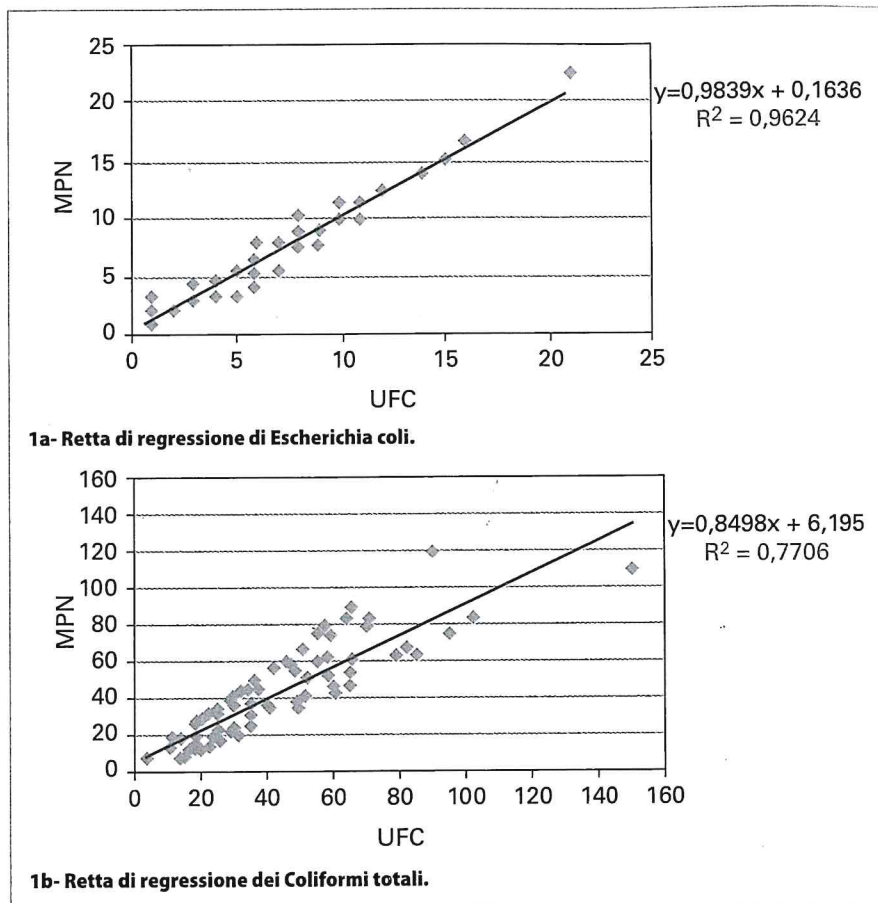
Colilert-18/Quanti-Tray® secondo UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005, per la ricerca dei batteri coliformi a 37°C e *Escherichia coli* in acque destinate al consumo umano

M. Tramparulo* M. Rea** B. Ciampi**,
A. Pressano**, C. Zanichelli**, C. Tucci**,
F. Aliberti***

*ARPAC – Dipartimento Provinciale di Napoli – Dir. dott.
** DTP – U.O. Acque Uso Umano – Responsabile dott. C.
*** Dipartimento delle Scienze Biologiche, Sezione Fisiologia,
Igiene, Università degli Studi Federico II, Napoli

Il metodo Colilert-18/Quanti-Tray®, che si basa sulla tecnologia a substrato definito (DST), è stato utilizzato per la determinazione della concentrazione dei Batteri Coliformi a 37°C e di *Escherichia coli* in campioni di acque destinate al consumo umano, ai sensi del DLgs 31/01

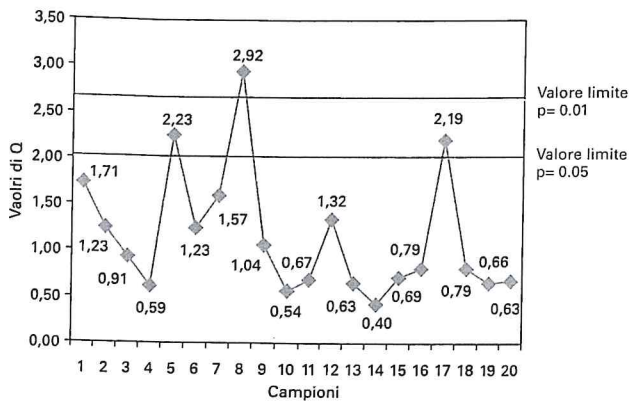
Il principio del metodo è basato sulla rilevazione delle proprietà enzimatiche dei Coliformi totali e di *E. coli* legate al possesso degli enzimi β-galattosidasi e β-glucuronidasi, rispettivamente, come riportato negli attuali e più moderni schemi di classificazione di questi microrganismi. Tale tecnica è in grado di rivelare in sole 18-22 ore simultaneamente e senza necessità di prove di conferma, che richiedono tempi di analisi più lunghi, sia i batteri Coliformi totali, sia i batteri *E. coli*. È possibile quindi poter comunicare rapidamente alle A.A.S.S.L.L. committenti eventuali non conformità rispetto ai requisiti di qualità previsti dalla norma di riferimento, al fine di poter attivare, quanto prima, tutte le azioni correttive volte alla gestione e alla rimozione del problema di rilevante importanza dal punto



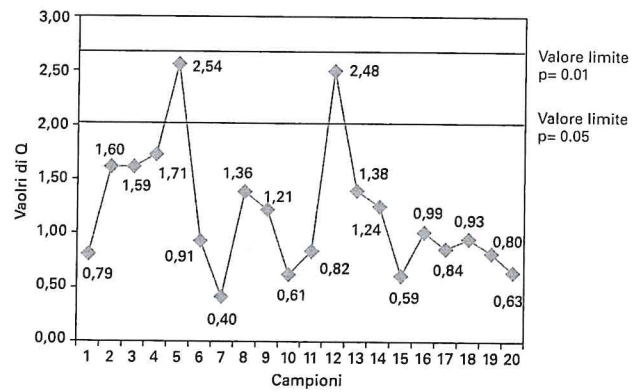
di vista igienico-sanitario (early warning). Nel Laboratorio di Microbiologia dell'U.O. Acque Uso Umano del DTP ARPAC di Napoli, è stato svolto, in via preliminare, uno studio di verifica dell'equivalenza tra il metodo di riferimento ISO 9308-1:2002 e il metodo DST su 80 campioni, da cui è emersa un'elevata correlazione tra i due sistemi per la ricerca di *E. coli* e una buona correlazione per la ricerca dei Coliformi totali. Successivamente è stato condotto uno studio di precisione attraverso la determinazione dei parametri di ripetibilità e riproducibilità, al fine di una

validazione del metodo Colilert-18/Quanti-Tray®, in accordo con la norma internazionale UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005. È stato così dimostrato che tale metodo è applicato correttamente all'interno del laboratorio da parte degli operatori. I Coliformi, appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae, sono batteri bastoncellari, gram negativi, aerobi e anaerobi facoltativi, non sporigeni. L'appartenenza al gruppo dei Coliformi, più che sulle caratteristiche sistematiche dei diversi microrganismi, è basata storicamente su specifiche reazioni biochimiche, cioè sul

2a- Ripetibilità Coliformi primo operatore



2b- Ripetibilità Coliformi secondo operatore



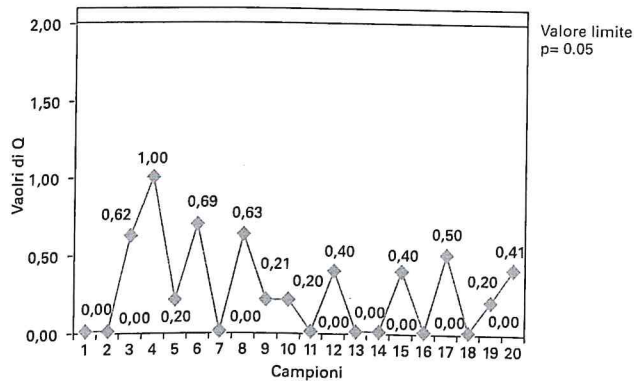
metodo utilizzato per il loro rilevamento che sfrutta la capacità di fermentare il lattosio con produzione di gas e acido alla temperatura di (35÷37)°C in 48 ore. Tuttavia, dei Coliformi presenti nelle acque potabili, una percentuale relativamente elevata non è in grado né di fermentare il lattosio, né di produrre gas nei tradizionali terreni di coltura. Diversamente, si è consolidata l'evidenza che un'alta percentuale, intorno al 99%, possiede l'enzima β -D-galattosidasi. È ipotizzabile quindi che la nuova definizione del gruppo prevista in una ISO di prossima pubblicazione sarà "membro delle *Enterobacteriacee* che esprime β -galattosidasi". *Escherichia coli* è un microrganismo bastoncellare, gram negativo, aerobio e anaerobio facoltativo, non sporigeno, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, inserito nel gruppo dei Coliformi. Secondo la tradizionale classificazione, la specie produce indolo in

terreni al triptofano ed è lattosio-fermentante, distinguendosi dai Coliformi non termotolleranti per la crescita alla temperatura di 44°C. Tuttavia, i metodi più classici utilizzati per la sua ricerca, risultano eccessivamente lunghi e laboriosi in quanto non selettivi e relativi al rilevamento dell'intero gruppo dei Coliformi per cui sono necessarie ulteriori prove di conferma per l'acquisizione della risposta. Anche per *E. coli* è stata confermata l'ipotesi che parte dei biotipi presenti nelle acque non sono in grado né di fermentare il lattosio, né di produrre gas nei tradizionali terreni di coltura. Inoltre, alcuni non sono termotolleranti e non producono indolo in terreni contenenti triptofano. Si è invece consolidata l'evidenza che un'alta percentuale di *E. coli*, intorno al 99%, e con l'eccezione dei sierotipi O157:H7, possiede l'enzima β -D-glucuronidasi. Anche in questo caso è prevedibile che la nuova definizione sarà "membro delle

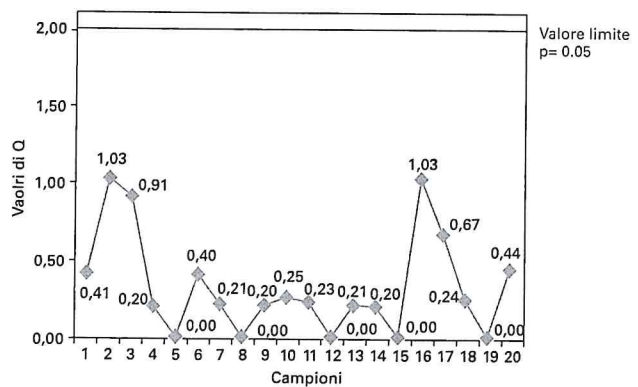
Enterobacteriacee che esprime β -galattosidasi e β -glucuronidasi". Rispetto al metodo ISO 9308-1:2002 che prevede la filtrazione su membrana (MF) e l'incubazione su un terreno agar Tergitol 7 TTC, la Tecnologia a Substrato Definito (DST) si dimostra più selettiva in quanto basata sul principio che solo i microrganismi ricercati riescono a utilizzare il substrato nutritivo che non presenta componenti utili alla crescita di eventuali altri batteri, riducendo quindi la possibilità di falsi positivi e di falsi negativi. La tecnica DST è in grado, inoltre, di rivelare in sole 18-22 ore simultaneamente e senza necessità di prove di conferma, che richiedono tempi di analisi più lunghi, sia i batteri Coliformi totali, sia i batteri *Escherichia coli*.

Materiali e metodi

Il Colilert-18/Quanti-Tray[®], è un metodo a pozzetti multipli che permette di determinare



3 a- Riproducibilità Coliformi primo operatore



3b- Riproducibilità Coliformi secondo operatore

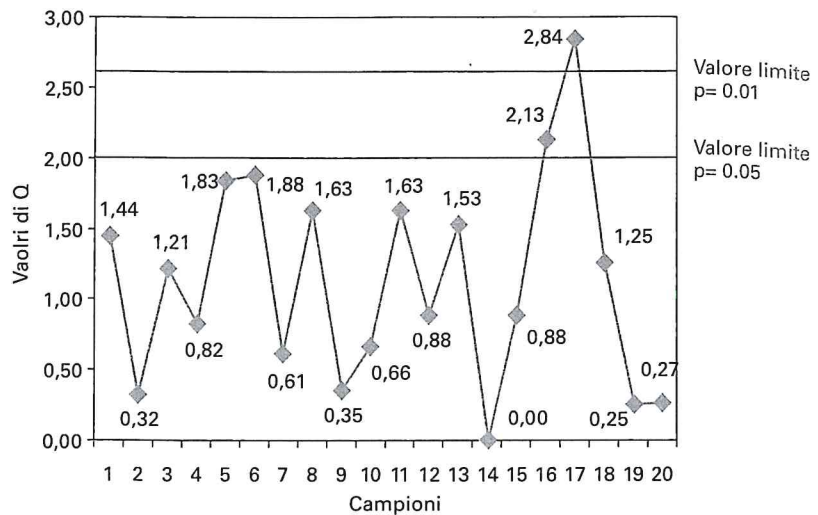
la concentrazione di Batteri coliformi a 37°C e di *E. coli* in campioni di acqua potabile tramite una stima statistica calcolata in funzione del numero di pozzetti positivi ottenuti. Si aggiunge a un volume di 100 mL del campione da analizzare un terreno disidratato contenente i substrati specifici di nutrimento per questi batteri. Dopo che il substrato si è sciolto, si versa il campione in una piastra a pozzetti multipli Quanti-Tray che viene sigillata e incubata a 36°C +/- 1 per 18 ore (max 22 ore). Fanno parte integrante del terreno due nutrienti/indicatori per i batteri bersaglio, l'o-nitrofenil-β-D-galattopiranoside (ONPG) e il 4-metil-umbelliferil-β-D-glucuronide (MUG). Durante il periodo di incubazione i Coliformi, se presenti, grazie alla β-galattosidasi, metabolizzano il nutriente/indicatore ONPG dalla cui idrolisi viene prodotto l'o-nitrofenolo, composto cromogenico che impartisce ai pozzetti una colorazione gialla. Se tra i Coliformi è presente anche *E. coli*, esso oltre a effettuare la reazione β-galattosidasi - ONPG, grazie alla β-glucuronidasi metabolizza il substrato MUG dalla cui idrolisi si ottiene il 4-metil-umbelliferone, composto fluorogenico. I pozzetti gialli appariranno quindi fluorescenti se osservati alla lampada di Wood alla lunghezza d'onda di 365 nm. Si conta il numero di pozzetti gialli e fluorescenti e i risultati vengono espressi in Most Probable Number (MPN)/100 ml.

Studio di comparazione

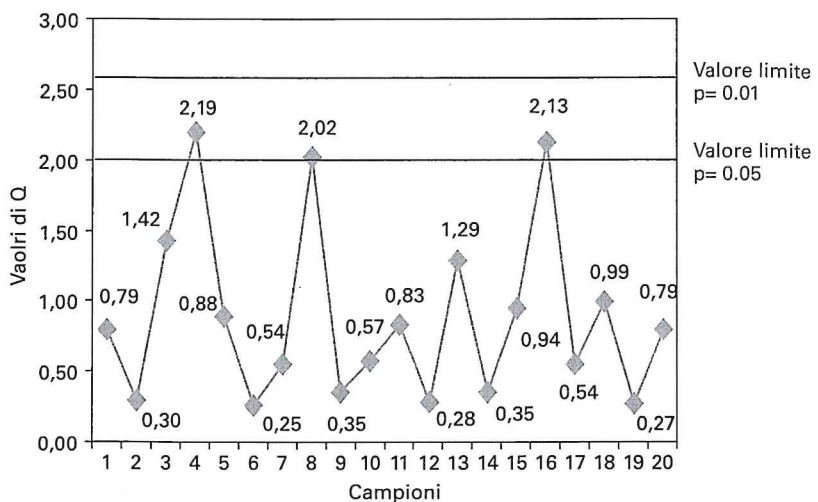
Per l'equivalenza dei metodi sono stati analizzati in parallelo 80 campioni di acqua potabile, ai quali è stata aggiunta acqua di scarico diluita al fine di ottenere un'acqua contaminata. I dati raccolti sono stati poi analizzati statisticamente, mediante l'analisi di regressione lineare.

Espressione dei risultati

Dall'esame dei campioni analizzati si è vista un'elevata correlazione pari a 0,96 per *E.coli*.



4a -Ripetibilità E. coli primo operatore



4b- Ripetibilità E. coli secondo operatore

Per quanto riguarda invece la ricerca dei Coliformi totali, la correlazione tra i 2 metodi, pari a 0,78, è risultata buona (fig.1a e 1b).

Studio di validazione

Definita una netta e significativa correlazione tra i due metodi, si è deciso di effettuare uno studio di precisione attraverso i parametri di ripetibilità e riproducibilità al fine di una validazione, secondo i criteri stabiliti dalla norma internazionale UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005, del metodo Colilert-18°, sia per il parametro Coliformi che per *E. coli*. I campioni di acqua potabile sono stati contaminati utilizzando acqua di scarico opportunamente diluita in maniera tale da ottenere un range di Coliformi compreso tra 20 e 50 e di *E. coli* compreso tra 5 e 20. La procedura descritta è stata eseguita da due operatori, ognuno dei quali ha effettuato 20 prove, in doppio,

rispettivamente per la determinazione dei Coliformi e di *E. coli*. Per la ripetibilità ogni operatore ha effettuato i duplicati e le letture dei propri campioni, mentre per la riproducibilità le letture sono state effettuate da operatori diversi. I dati ottenuti dalle varie letture sono stati inseriti in un foglio di calcolo specifico e si è calcolata, sia per la ripetibilità, sia per la riproducibilità, la variabile del controllo di precisione che è un deviatore standard Q.

$$Q = \frac{|D|}{\log SD(D)}$$

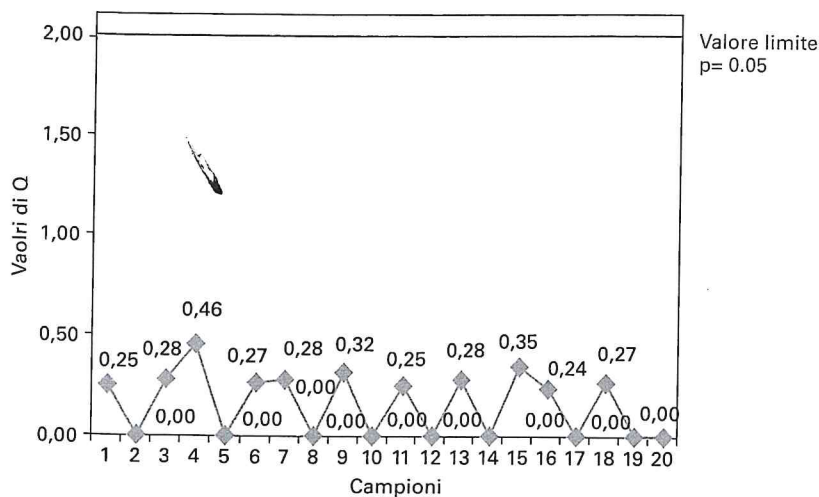
dove:

- D = differenza tra i logaritmi dei 2 valori

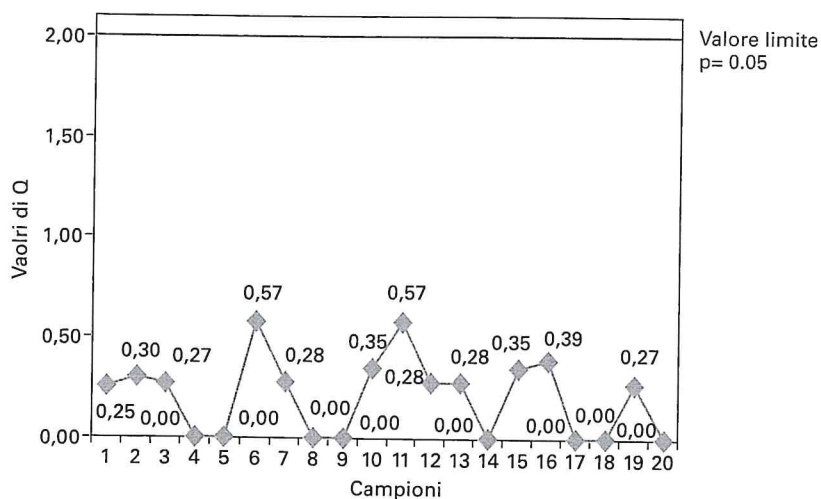
MPN delle analisi duplicate

[logMPN(A) - logMPN(B)]

- logSD(D) = deviazione standard stimata o presuppunta della differenza.



5a- Riproducibilità E. coli primo operatore



5b- Riproducibilità E. coli secondo operatore

Per ciascun campione, Q è stato confrontato con un valore soglia ottenuto dalla distribuzione statistica della variabile normale standardizzata. Per il criterio di test di controllo della precisione al 95%, il valore soglia, oltre il quale Q non è considerato accettabile, è 2,0 (arrotondato da 1,96), mentre al 99% il valore soglia è 2,6 (arrotondato da 2,58); quindi se il valore di Q è maggiore del valore soglia il test di controllo della precisione non è superato, mentre se il valore di Q è minore o uguale al valore soglia il test di controllo della precisione è superato. La verifica del metodo è correlata alla frequenza relativa di fallimento dei singoli test di controllo della precisione; Se si utilizza un criterio di controllo al 95% il numero di test di controllo falliti non deve superare 3 su 20, mentre per il criterio al 99% il numero di test di controllo falliti non deve superare 1 su 20.

Risultati

Sono stati calcolati i valori del deviatore standard (Q). Per determinare la precisione del metodo, su ciascun campione alla volta viene eseguito un test del grado di corrispondenza dei risultati analitici duplicati, basato sul confronto tra il valore Q e un valore soglia. Si osserva che il metodo applicato da ciascun operatore viene effettuato in maniera corretta, in quanto in nessun caso viene superato il numero massimo di fallimento consentiti (figg. 2a e 2b; 3a e 3b; 4a e 4b; 5a e 5b).

Conclusioni

La scelta di metodi di analisi alternativi, quali l'utilizzo del Colilert-18/Quanti-Tray®, rispetto a quelli di riferimento, per la ricerca dei Batteri Coliformi a 37° C e di E. coli in campioni di acque destinate al consumo umano, permette di fornire un risultato in

sole 18-24 h. Lo studio di correlazione, tra il metodo di riferimento previsto dalla ISO 9308-1 e il metodo DST, eseguito all'interno del laboratorio su 80 campioni ha mostrato un'elevata correlazione, pari a 0,96, per la ricerca di E. coli, e una correlazione buona, pari a 0,78 per la ricerca dei Coliformi totali; lo studio di precisione ha dimostrato che tale metodo è applicato correttamente all'interno del laboratorio da parte degli operatori, le prestazioni sono sotto controllo statistico ed è quindi garantita l'affidabilità dei risultati di prova.

© RIPRODUZIONE RISERVATA

bibliografia

- Fricker C.R., Niemela S.I. e Lee J.V. Comparison of the International Standards Organisation reference method for the detection of Coliforms and Escherichia coli in water with a defined substrate procedure.
- APAT/IRSA-CNR – Metodi Analitici per le Acque. Volume terzo, 29/2003.
- UNI EN ISO 9308-1:2002 – Codice ICS: 07.100.20 | 13.060.30. Qualità dell'acqua – Ricerca ed enumerazione di Escherichia coli e Batteri coliformi – Metodo di filtrazione su membrana.
- Fricker C. – Methods for the detection of bacteria in water: The benefits of the Defined Substrate Technology approach.
- Bonadonna L.; Ottavini M.; Rapporto ISTISAN 07/5: Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi microbiologici; ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'
- Association of Official Analytical Chemists (1995) – Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists; AOAC Official Method 991.15. Total Coliform and Escherichia coli in water, Defined Substrate Technology (Colilert) Method, 16th Edition, AOAC International, Arlington, Vi.
- Rice E., Allen M., Edemberg S., Efficacy of β -glucuronidase assay for identification of E. coli by the defined-substrate technology Appl. Environ. Microbiol. 1203-1205, (56-5) 1990.
- Tryland I., Fiskdal L. Enzyme characteristics of β -D-glucuronidase positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and Escherichia coli.
- Mantelli F., Fiorentino P.G. Breve guida per le analisi delle acque potabili.
- ISO 9308-1:2000 Qualità dell'acqua. Rilevazione ed enumerazione di Escherichia coli e batteri coliformi – Parte 1: Metodo di filtrazione a membrana. Ginevra: International Organization for Standardization.
- Interlaboratory Equivalence Study. According to ISO 17994: Colilert-18® Vs ISO 9308-1. Verification. IDEXX.
- Controllo di precisione (ripetibilità e riproducibilità) di Quanti-Tray®. IDEXX.