

LINEE GUIDA PER LE BUONE PRATICHE DI LABORATORIO. ANALISI MICROBIOLOGICA DELLE ACQUE

0. Generalità

Il controllo di qualità consiste in una serie di procedure che consentono di verificare la qualità di un prodotto e quella dei risultati ottenuti. È la valutazione continua dello stato delle procedure, dei metodi di analisi e dei dati prodotti dal laboratorio con l'obiettivo di ridurre al minimo tutte le circostanze che potrebbero comportare difformità rispetto ai risultati da raggiungere.

L'attuazione di programmi di controllo di qualità, che comporta un grosso carico di lavoro, è comunque necessaria se si considerano gli effetti sui risultati finali. L'applicazione di procedure di controllo, che prevedono un monitoraggio continuo di tutte le attività del laboratorio e dei materiali utilizzati, risulta imprescindibile dalla riproducibilità, precisione ed accuratezza dei dati prodotti in quanto conduce all'identificazione, riduzione o eliminazione di errori casuali, sistematici o grossolani.

1. Ambienti di lavoro

Le condizioni ambientali dei locali dove vengono effettuate determinazioni microbiologiche devono essere tali da non invalidare i risultati, né influenzare l'incertezza di misura e garantire la sicurezza degli operatori.

Per produrre risultati di qualità servono presupposti adeguati. Un'organizzazione idonea del laboratorio, la sua collocazione, le condizioni strutturali e ambientali, esterne e interne possono avere influenza sul personale, sul funzionamento delle attrezzature e anche sull'efficienza e l'efficacia del programma di assicurazione di qualità.

I requisiti di base che dovrebbe possedere un laboratorio e il suo ambiente per essere in grado di produrre risultati di qualità schematicamente dovrebbero basarsi su:

- spazio sufficiente;
- disposizione concepita per l'efficienza;
- spazio sufficiente per le attrezzature;
- ufficio per il personale amministrativo;
- guardaroba per tutto il personale;
- depositi per i campioni, le attrezzature, i prodotti chimici e la vetreria.

Le funzioni di base del laboratorio dovrebbero svolgersi preferibilmente in aree separate o in parti definite della zona principale del laboratorio, distinguendo le zone in base alle operazioni da svolgere:

- pulizia della vetreria e attrezzature;
- sterilizzazione della vetreria usata e terreni di coltura incubati;
- preparazione e sterilizzazione dei terreni di coltura;
- inoculo di terreni di coltura;
- incubazione di colture;
- lettura dei risultati;
- interpretazione di risultati e stesura dei rapporti.

In condizioni ideali, un laboratorio di microbiologia dovrebbe comporsi di una serie di aree separate; in alternativa è comunque necessario che lo svolgimento del lavoro sia tale da distinguere le zone 'pulite' da quelle 'sporche'.

Dovrà essere garantita la sicurezza del personale. A tale scopo è opportuno tenere in considerazione quanto indicato dal D.Lvo. 626/94 e successive modifiche e integrazioni dove vengono riportate anche

le misure da applicare all'interno dei laboratori di microbiologia in funzione della natura degli agenti biologici da ricercare o trattare al fine di valutare i rischi per i lavoratori.

I laboratori microbiologici devono essere considerati ambienti contaminati e il sistema di ventilazione dovrebbe essere concepito in modo da evitare il passaggio dell'aria dai laboratori alle sale attigue. Qualora all'interno dei locali debba essere mantenuto un certo livello di temperatura, umidità e aerazione (ricambio d'aria), dovranno essere installati idonei sistemi di condizionamento e filtrazione dell'aria che non dovranno creare interferenze con l'esecuzione delle prove e compromettere l'attendibilità dei risultati.

I terreni di coltura, i prodotti chimici e i reattivi dovranno essere stoccati in zone protette dalla luce diretta del sole per non alterarne le prestazioni. I locali dovranno essere protetti da condizioni ambientali anomale quali umidità, polvere, temperature elevate, vibrazioni ed esposizione a luce solare diretta.

I locali dovranno essere tenuti chiusi durante l'esecuzione delle prove e ne dovrà essere vietato l'accesso a persone non autorizzate. In tutti i locali del laboratorio sarà tassativamente vietato fumare e, tramite opportune segnalazioni dovranno essere elencate le generali norme di igiene e di buon comportamento.

Tutte le apparecchiature e le sorgenti di alimentazione dovranno essere adatte alle prove da effettuare e l'adeguamento a particolari condizioni ambientali dovrà essere sottoposto a controllo.

Banconi, muri e pavimenti dovranno essere lisci, facili da pulire e disinfettare e adattabili a facili manutenzioni e riparazioni. I banconi dovranno essere attrezzati in modo idoneo con gas, dispositivi di scarico, elettricità, acqua distillata e rubinetti di acqua fredda e calda. Per le superfici di lavoro, si consiglia di effettuare, tramite l'uso di piastre a contatto, la determinazione della carica microbica, di muffe e lieviti dopo l'attività lavorativa e dopo la disinfezione per controllare l'efficienza della pulizia. Allo stesso modo si potranno applicare gli stessi controlli a termostati, frigoriferi e cappe e in casi di contaminazione si potrà procedere alla sanitizzazione. Tutte le operazioni di pulizia, disinfezione e sanitizzazione dovranno essere monitorate con idonei sistemi di controllo da porre in atto all'interno del laboratorio; di ogni operazione dovrà essere necessario tenere apposita registrazione.

Il monitoraggio biologico degli ambienti costituisce un punto basilare per avere la garanzia di operare in locali dove le prove non vengono influenzate da inquinamenti indipendenti dalla natura del materiale in esame. Un corretto monitoraggio biologico ambientale potrà comprendere controlli dell'aria, delle superfici di lavoro, dei termostati, dei frigoriferi e delle cappe a flusso laminare. Le frequenze dei controlli saranno definite all'interno di ogni laboratorio in funzione dell'effettivo carico inquinante gravitante nel laboratorio stesso.

Per il controllo dell'aria ambiente e dell'aria della cappa a flusso laminare si potranno utilizzare campionatori meccanici o l'eseguire l'analisi qualitativa gravitazionale con capsule contenenti terreni colturali lasciate aperte per un certo intervallo di tempo.

Nel caso i controlli e i processi di sanitizzazione non abbiano frequenze molto elevate, generalmente potranno essere mensili o semestrali, è bene, per dimostrare che le prove non vengono influenzate da eventuali inquinamenti ambientali, porre, ad ogni ciclo di determinazioni, una capsula di terreno colturale non seminato (bianco) che segua il normale ciclo lavorativo e che non dovrà presentare alcuna crescita alla fine del ciclo stesso.

2. Strumentazione

Le apparecchiature di prova in dotazione ad un laboratorio di microbiologia devono garantire affidabilità di funzionamento e di risposta in modo da non alterare l'accuratezza e la precisione del risultato finale della prova. Pertanto dovranno essere sempre tenute in perfetta efficienza e installate in locali che garantiscano una adeguata protezione dal deterioramento; l'efficienza dovrà essere garantita con opportune procedure per la manutenzione e la taratura.

Di seguito, per opportuna conoscenza, vengono riportate le definizioni di manutenzione ordinaria, straordinaria, programmata e di taratura.

- **Manutenzione ordinaria:** operazioni che devono essere messe in atto dall'operatore al momento dell'uso per garantire il buon funzionamento dell'apparecchiatura.
- **Manutenzione programmata:** intervento che viene effettuato a tempi prefissati per evitare decadimenti nel buon funzionamento dell'apparecchiatura. Questi interventi sono normalmente affidati alla ditta fornitrice con la quale si stipula un contratto di manutenzione annuale.
- **Manutenzione straordinaria:** intervento effettuato dopo il verificarsi di guasti o malfunzionamenti. Questo tipo di interventi vengono effettuati su specifica richiesta e vengono eseguiti normalmente da un tecnico specializzato della ditta fornitrice dopo che l'operatore ha verificato l'anomalia di comportamento.
- **Taratura:** operazione atta a garantire che l'apparecchio e lo strumento in uso siano in grado di fornire misure entro i limiti di tolleranza previsti dal capitolato d'acquisto. In senso stretto, la definizione si addice maggiormente a quelle apparecchiature che possono fare riferimento a strumenti campioni primari; per le altre può essere intesa come insieme di operazioni finalizzate al controllo del buon funzionamento dell'apparecchiatura.

Nell'ambito dei controlli da effettuarsi in laboratorio, sarà opportuno prevedere quindi:

- modalità di taratura e manutenzione
- loro frequenza
- personale responsabile delle verifiche

Per ogni apparecchiatura dovrà essere prevista un'apposita "Scheda" che dovrà riportare tutte le informazioni utili sulla provenienza, l'acquisto, l'installazione, il collaudo, le date di ricevimento e messa in funzione, i riferimenti alle procedure di taratura e manutenzione quando necessari, la loro periodicità e i dati del fornitore e dell'assistenza tecnica.

Dovrà essere predisposta inoltre una "Scheda di Manutenzione" che riporti tutte le operazioni effettuate relative alla verifica, alle sostituzioni, alla pulizia con la data di svolgimento dell'operazione e la firma del tecnico che l'ha effettuata.

Dovrà essere prevista inoltre una "Scheda di Taratura" su cui verrà riportato il riferimento alla procedura di taratura, il programma di taratura, la data di svolgimento della stessa e della futura taratura, la firma del tecnico e i riferimenti ai campioni primari o materiali di riferimento utilizzati per il controllo. Qualora la taratura venga attuata da un centro esterno dovrà essere riportata tutta la documentazione inerente.

Un'apparecchiatura che, a seguito di taratura, abbia rilevato una non idoneità al suo utilizzo, dovrà essere messa fuori servizio. L'evento dovrà essere segnalato apponendo un'etichetta visibile sull'apparecchiatura con la dicitura "Fuori Servizio" e la data in cui l'evento è stato rilevato. L'apparecchiatura non potrà essere in nessun modo utilizzata fino a quando la riparazione o la taratura di nuovo effettuata non dimostrino che è di nuovo funzionante. L'evento dovrà essere riportato sulla scheda di taratura.

Di seguito sono elencate le principali apparecchiature di un laboratorio di microbiologia dove vengono effettuati controlli di acque destinate al consumo umano; sono anche descritte le operazioni di base di manutenzione e taratura cui sottoporre le apparecchiature.

2.1. Cappa a flusso laminare

Per le cappe a flusso laminare le normali operazioni di manutenzione consistono nella sostituzione dei prefiltri secondo le indicazioni della ditta costruttrice, nella pulizia/disinfezione delle superfici interne con opportuni disinfettanti e nel controllo dell'efficienza dei filtri. Se le cappe sono dotate di sistema a lampade a raggi ultravioletti, è necessario predisporre cicli di accensione a cappa chiusa con successiva attivazione del flusso per garantire l'allontanamento dell'ozono presente in atmosfera.

Verificare periodicamente la presenza di microrganismi nell'aria filtrata esponendo per 30 minuti capsule di Petri aperte contenenti terreni culturali agarizzati per la crescita degli eterotrofi e dei miceti, disposte in punti rappresentativi della superficie di lavoro o, in alternativa, usare contatori di particelle.

2.2. Bilancia

Le bilance dovranno essere collocate su supporti stabili anti - vibrazioni e controllate che siano a bolla. Per la manutenzione si richiede la normale pulizia.

Per quanto riguarda il controllo, si utilizzano campioni di riferimento da confrontare almeno con frequenza annuale con campioni di riferimento primari. Almeno una volta l'anno è opportuno fare effettuare una taratura con materiale certificato verificando l'intervallo di misura completo della bilancia da personale qualificato o da un ente esterno che rilasci un certificato di taratura.

A tale scopo, per inciso, si ritiene opportuno riportare le definizioni della Norma ISO Guide 30:1992 sui materiali di riferimento (MR) e materiali di riferimento certificati (MRC).

- **Materiali di riferimento (MR):**

materiale o sostanza per la quale uno o più valori delle proprietà sono sufficientemente omogenei e ben stabiliti da essere usati per la taratura di un apparecchio, per la valutazione di un metodo, per la misurazione o per l'assegnazione di valori a materiali.

- **Materiali di riferimento certificati (MRC):**

materiale di riferimento accompagnato da un certificato, per il quale uno o più valori delle proprietà sono certificati sulla base di una procedura che stabilisce la loro riferibilità a un'accurata realizzazione delle unità nelle quali i valori delle proprietà sono espressi e per il quale ciascun valore certificato è accompagnato da un'incertezza ad un calcolato livello di confidenza.

2.3. pHmetro

Gli elettrodi del pHmetro devono essere condizionati e conservati secondo le istruzioni del costruttore. Dopo ogni uso devono essere puliti con acqua distillata.

La taratura va effettuata periodicamente utilizzando soluzioni tampone di riferimento (ad es., pH 4 e pH 7 a 20°). Le soluzioni vanno conservate nelle migliori condizioni e non oltre la data di scadenza. Le aliquote giornaliere utilizzate devono poi essere scartate dopo la taratura.

Va inoltre controllato periodicamente lo stato di efficienza degli elettrodi registrando i valori in mV in corrispondenza delle tarature a pH 4 e pH 7. La differenza tra due misurazioni in rapporto al valore teorico indicato dal costruttore rappresenta un indice di invecchiamento dell'elettrodo.

2.4. Autoclave

L'autoclave va mantenuta in perfette condizioni operative. I controlli dello stato di sicurezza devono essere effettuati dagli enti preposti secondo le disposizioni legislative vigenti.

La taratura va effettuata almeno con frequenza annuale controllando la correlazione tra pressione e temperatura tramite un manometro campione certificato oppure va fatta effettuare da ditte specializzate che rilascino idoneo documento di avvenuta taratura.

In ogni caso è bene effettuare le operazioni di manutenzione di seguito indicate.

- Verifica dell'efficienza del termometro nelle condizioni operative. Impostare la temperatura e il tempo di durata dei cicli richiesti e controllare che, quando l'autoclave è in pressione, il valore di temperatura sia conforme a quello riportato sulla tabella di correlazione pressione/temperatura del vapore saturo;
- verifica dell'efficienza del blocco del portello nelle condizioni di esercizio. Controllare che, quando è in corso il ciclo di sterilizzazione, il dispositivo di blocco del portello rimanga bloccato e il portello non si apra;
- verifica del livello dell'acqua. Prima dell'avvio di un ciclo di sterilizzazione controllare che il livello dell'acqua nell'autoclave sia compreso fra l'indice minimo e il massimo riportati sull'indicatore di livello;
- verifica funzionale dello sfiato. Mentre l'autoclave raggiunge la pressione di esercizio, verificare la tenuta delle valvole manuali di sfiato;
- verifica dello stato di conservazione della guarnizione del portello. Verificare che non vi siano rotture, scorie o frammenti; lubrificare con grasso al silicone, evitare l'uso di prodotti chimici;

- verifica dell'efficienza della valvola di sicurezza. Impostare un valore di pressione superiore al valore indicato dall'indice rosso sul manometro e controllare che, prima di raggiungere tale valore, la valvola di sicurezza cominci a sfiatare;
- controllo del dispositivo elettronico di livello. Mentre l'autoclave è in funzione, scaricare lentamente l'acqua aprendo il rubinetto di scarico e verificare che raggiunto il livello minimo intervenga l'allarme e si accenda la spia di segnalazione;
- ispezione della camera. Ispezionare l'interno della camera e del portello dell'autoclave per controllarne lo stato di conservazione; pulire le superfici interne con detergente idoneo per superfici in acciaio rimuovendo eventuali residui e incrostazioni;
- controllo dell'efficienza dei processi di sterilizzazione. Utilizzare indicatori biologici come strisce o ampole di spore di *Bacillus stearothermophilus* normalmente disponibili in commercio. Si consiglia di effettuare questo controllo con frequenza almeno mensile.

2.5. Incubatore

Le normali indicazioni d'uso prevedono la protezione delle pareti dell'incubatore dalla luce solare diretta. È da evitare inoltre l'introduzione di grandi quantità di materiale lasciando spazi per permettere la circolazione dell'aria.

La normale manutenzione prevede pulizia, decontaminazione e rimozione della polvere dal sistema di ventilazione. Occorre inoltre controllare giornalmente la temperatura dell'incubatore con un termometro il cui bulbo sia immerso in glicerolo contenuto in una bottiglia sigillata, oppure, qualora ne siano dotati, controllando la temperatura indicata dal termometro permanente installato sull'apparecchiatura. La deviazione tra la temperatura impostata e quella rilevata non dovrà essere superiore a $\pm 1^\circ$ per i termostati/frigotermostati impostati a 20° , a 36° e a 44° .

Per la taratura, e quindi per il controllo del termometro permanente, utilizzare un termometro di riferimento certificato (fatto tarare annualmente da un centro SIT) inserito nella camera del termostato e registrare i valori di temperatura per un intervallo di tempo di almeno 4 ore con frequenze di 30 min avendo cura di non aprire lo sportello del termostato durante l'esecuzione del controllo.

È bene annotare gli esiti del controllo di taratura su apposito registro, riportando per ogni rilevamento:

- l'ora in cui il rilevamento è stato effettuato;
- il valore di temperatura letto sul termometro campione di riferimento;
- il valore di temperatura letto sul termometro permanente installato sull'apparecchiatura;
- la deviazione evidenziata;
- la deviazione massima ammissibile;
- la data di effettuazione, la data del successivo controllo di taratura e la firma di chi l'ha effettuata.

2.6. Frigoriferi, celle frigorifere, congelatori

I frigoriferi e le celle frigorifere devono essere caricati in modo che l'aria circoli liberamente, e i congelatori caricati con accortezza in modo da mantenere all'interno una temperatura bassa.

Laddove è possibile, frigoriferi, termostati e congelatori dovrebbero essere messi sotto gruppo di continuità; in caso contrario sarebbe necessario predisporre sistemi che evidenzino le eventuali anomalie dovute al conseguente rialzo termico.

È opportuno tenere nettamente separati, all'interno dei frigoriferi, terreni di coltura e reagenti non inoculati da campioni da analizzare, ceppi di microrganismi e terreni inoculati.

Devono essere effettuate con cadenza periodica le operazioni che prevedano:

- rimozione della polvere dalle piastre esterne di aerazione
- sbrinamento
- pulizia e decontaminazione dell'interno delle celle, dei frigoriferi e dei congelatori.

Controllare periodicamente i termometri permanenti installati su frigoriferi e congelatori confrontandoli con un termometro campione di riferimento certificato e usando la stessa procedura indicata nel caso degli incubatori. Tenere anche per questi apposita registrazione.

2.7. Bagno termostatico

Per una buona manutenzione dei bagni termostatici è consigliabile effettuare periodicamente il controllo del livello del liquido, monitorare la temperatura del bagno, sostituire l'acqua contenuta nella vasca e sanitzare la vasca.

Controllare periodicamente i termometri permanenti installati confrontandoli con un termometro campione di riferimento certificato usando la stessa procedura indicata nel caso degli incubatori. Tenere anche per questi apposita registrazione.

2.8. Microscopio ottico

Collocare il microscopio in posizione stabile. Si consiglia la dotazione di un sistema per l'osservazione in contrasto di fase e di una serie di obiettivi, in modo da coprire un intervallo di ingrandimenti sufficientemente elevato, e di sistemi per la regolazione dell'intensità luminosa.

La manutenzione, eseguita da personale specializzato, consiste nella rimozione sia della polvere dagli oculari e dagli obiettivi usando cartine ottiche sia, dopo l'uso, di tracce di olio dagli obiettivi usati per immersione. Controllare saltuariamente la lubrificazione delle parti mobili e sostituire la lampada di illuminazione, quando necessario, seguendo le istruzioni della ditta costruttrice.

Quando non in uso, il microscopio va tenuto coperto e al riparo dalla luce, per evitare danni alle lenti.

2.9. Incubatore in atmosfera modificata

Si tratta di giare o apparecchiature atte ad ottenere e mantenere condizioni di atmosfera modificata (es., anaerobiosi) per tutta la durata del tempo di incubazione.

Porre attenzione all'inserimento del materiale, affinché avvenga nel più breve tempo possibile, in modo da non alterare sensibilmente le condizioni interne, ed alla quantità del materiale stesso in relazione alle dimensioni dell'incubatore.

Sia che si tratti di giare che di incubatori, per la manutenzione bisognerà garantire le normali operazioni di pulizia e disinfezione.

Per quanto riguarda la taratura, nel caso di incubatori, seguire le indicazioni riportate nel paragrafo corrispondente.

È opportuno controllare il mantenimento delle condizioni atmosferiche adatte allo sviluppo dei microrganismi ricercati. In questo caso è possibile misurare la crescita di batteri riferibili a diverse specie, una inibita dalle condizioni atmosferiche e dalle temperature impostate e l'altra in grado di crescere nelle condizioni impostate.

Per la verifica si potranno utilizzare quindi ceppi ATCC certificati come controllo positivo e negativo. Si consiglia inoltre l'introduzione di indicatori redox, contenenti blu di metilene e resazurina atti a dimostrare l'avvenuto raggiungimento delle condizioni atmosferiche desiderate.

2.10. Micropipette

Micropipette manuali, elettroniche, monocanale o multicanale sono disponibili in commercio. Quelle manuali sono le più utilizzate all'interno dei laboratori. Si consiglia l'utilizzo di puntali monouso; inoltre è opportuno mantenere la pipetta a temperatura ambiente, evitare che subisca urti, tenerla in posizione verticale e procedere ad una regolare pulizia, manutenzione e taratura.

2.11. Dispensatore

Si intendono quelle apparecchiature utilizzate per distribuire terreni di coltura e reagenti in provette, bottiglie o capsule di Petri.

È opportuno controllare l'accuratezza dei volumi dispensati e, nel caso si debbano distribuire reagenti o terreni sterili, è opportuno controllare che le parti dell'apparecchio in contatto con essi siano in condizioni asettiche.

Mantenere le apparecchiature in perfette condizioni mediante accurata pulizia dopo ogni ciclo lavorativo, in accordo alle indicazioni della ditta costruttrice.

2.12. Termometri

I termometri in utilizzo presso il laboratorio devono essere tarati periodicamente mediante confronto con strumenti certificati da appositi enti. A titolo esemplificativo ci si può dotare di un termometro campione primario fatto tarare annualmente da un ente accreditato con cui effettuare tutte le verifiche indicate per incubatori, celle frigorifere, congelatori.

3. Materiali

3.1. Membrane filtranti

È preferibile utilizzare membrane sterili confezionate singolarmente o in nastri, purché sigillate e certificate dalla ditta produttrice. Registrare la data di ricevimento ed il numero di ogni lotto di membrane acquistate e verificare la capacità di sviluppo di colonie batteriche.

3.2. Capsule di Petri

Preferire capsule in plastica sterile. È possibile effettuare il controllo di sterilità delle capsule in contemporanea con il normale controllo di fertilità.

3.3. Terreni di coltura

Preferire terreni disidratati o già pronti evitando di preparare i terreni dai singoli ingredienti. In questo caso, i risultati ottenuti dalle analisi potrebbero essere difformi rispetto ad analisi svolte utilizzando terreni disidratati e controllati dal produttore. Inoltre, le procedure di preparazione di terreni per singoli componenti, nel caso di sostanze tossiche, potrebbero costituire un rischio aggiuntivo per la salute degli operatori. In queste circostanze, è necessario adottare particolari cautele nella preparazione dei substrati e utilizzare dispositivi di protezione individuale (DPI).

Sulle confezioni di terreni di coltura disidratati e di reattivi (coloranti, additivi, soluzioni) reperibili in commercio apporre sia la data di ricevimento che quella di effettiva apertura. Se i reagenti e i terreni sono preparati in laboratorio per pesata dai costituenti di base, devono essere identificati con una etichetta riportante le seguenti informazioni: eventuale diluizione, data di preparazione, data di scadenza, modalità di conservazione, nome del preparatore, eventuali segnali di pericolosità.

Per controllare l'affidabilità e la conformità alle specifiche richieste si consiglia di effettuare i controlli di seguito elencati.

- Controllo del pH prima della sterilizzazione. Confrontare il valore misurato mediante pHmetro tarato, con quello dichiarato in etichetta e se la deviazione è superiore a quella ammessa modificare il pH mediante aggiunte di NaOH o HCl 0,1 N. Da effettuare ad ogni preparazione del terreno.
- Controllo della sterilità. Porre ad incubare una capsula o un tubo contenenti il solo terreno da testare secondo le modalità previste dal metodo analitico, e verificare la completa assenza di crescita batterica e fungina. In caso contrario scartare tutto il lotto preparato e controllare le procedure di sterilizzazione e preparazione. Da effettuare ad ogni preparazione del terreno.
- Controllo della fertilità del terreno da testare, cioè la sua idoneità alla crescita del microrganismo target. Strisciare sulla superficie del terreno agarizzato o inoculare nel brodo un'ansata di una brodocoltura allestita con un ceppo puro certificato di riferimento. Incubare con le modalità previste dal metodo analitico e verificare la crescita di colonie con le caratteristiche morfologiche tipiche. Ogni laboratorio dovrà stabilire la frequenza di controllo.
- Controllo della selettività del terreno da testare mediante l'inibizione di crescita di un microrganismo opportunamente scelto. Strisciare sul terreno agarizzato o inoculare nel brodo un'ansata di brodocoltura allestita a partire da un ceppo puro certificato la cui crescita dovrebbe essere inibita nel substrato in esame. Incubare con le stesse modalità indicate dal metodo analitico

e verificare l'assenza di crescita di colonie. Ogni laboratorio dovrà stabilire la frequenza di controllo.

Per quanto riguarda i ceppi microbici di controllo per lo svolgimento delle prove di fertilità e selettività dei terreni colturali si rimanda alle indicazioni fornite dalle ditte produttrici.

Tutti i controlli effettuati dovranno essere accuratamente documentati, cioè registrati ed archiviati.

4. Controllo della ripetibilità del metodo

Su campioni di acqua destinata al consumo umano si dovrà effettuare il conteggio dei microrganismi presenti considerando, come requisito minimo, i parametri indicati nel D.Lvo n. 31 del 2 febbraio 2001 relativo alla qualità delle acque destinate al consumo umano e applicando i metodi di prova o i metodi alternativi selezionati e approvati sulla base degli studi comparativi, così come richiesto dalla Direttiva Europea 83/98/CE.

La valutazione dell'incertezza di misura e della ripetibilità del dato analitico risulta molto critica ai livelli previsti dalla normativa. Vengono di seguito riportati alcuni modelli per il calcolo e la verifica della ripetibilità e dell'incertezza di misura all'interno dei laboratori.

Vista la complessità dell'argomento, la sua novità in campo microbiologico e la necessità di un progressivo approfondimento, si auspica che ogni laboratorio sperimenti e verifichi al suo interno l'applicabilità dei metodi proposti.

È necessario innanzitutto specificare che, per i controlli analitici da effettuare in microbiologia delle acque, per ciascun metodo dovrà essere fornito almeno il valore di ripetibilità interno del laboratorio.

Per calcolare la ripetibilità di un metodo è necessario che uno stesso operatore svolga una serie di almeno 10 prove sullo stesso campione di acqua. Il valore medio dovrà essere calcolato nel modo consueto per ciascuna serie di prove effettuate. Calcolare lo scarto quadratico medio mediante la seguente formula.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_m)^2}{n-1}}$$

dove:

x_m = valore medio calcolato

x_i = valore riscontrato nella i-esima prova

n = numero di prove

Il valore di ripetibilità r è quindi calcolato con la formula

$$r = \sqrt{2} \cdot t \cdot s$$

dove:

t = t di Student relativo al numero di prove svolte ed ai gradi di libertà considerati relativamente al 95% di probabilità: per 10 prove il t di Student vale 2,2622.

In questo caso quindi il valore r corrisponde a

$$r = 3,2 \times s$$

Per valori di lettura compresi fra 0 e 15 U.F.C. è possibile riferirsi alla Tabella 1 rilevata dalla norma ISO 7218: 1996 "Microbiology of food and animal feeding stuff - General rules for microbiological examinations" per le singole specie di microrganismi e alla Tabella 2, estratta dalla stessa norma, per la valutazione della carica batterica.

Versione on-line su sito www.iss.it

Quando si devono esaminare campioni di acqua in alimentazione agli impianti di potabilizzazione oppure provenienti da corsi d'acqua o bacini superficiali è probabile riscontrare valori di microrganismi superiori a 20 unità. Pertanto, in questi casi, è consigliabile valutare l'incertezza di misura applicando il modello di distribuzione di Poisson e calcolare la "ripetibilità" in termini di scarto tipo di questa distribuzione.

Sulla base del modello di distribuzione di Poisson si ha che:

- il valore della varianza è numericamente uguale al valore del conteggio effettuato (C);
- lo scarto tipo risulta essere la radice quadrata del conteggio stesso.

Per una singola prova si può pertanto accettare che l'intervallo di confidenza sia assunto come :

$$C \pm 2 \times s$$

dove:

C = conteggio delle colonie presenti nel terreno di coltura;

s = scarto tipo espresso come $C^{0.5}$.

Il controllo della ripetibilità del dato analitico può essere effettuato eseguendo prove in doppio (stesso campione e stesso operatore) e verificando poi se la seguente equazione viene rispettata :

$$|X_1 - X_2| \leq 2 \times \sqrt{X_1} + X_2$$

dove:

X_1 e X_2 sono rispettivamente i due conteggi della prova ripetuta.

Se $|X_1 - X_2| \leq 2 \times \sqrt{X_1} + X_2$ la differenza è accettabile

Se $|X_1 - X_2| \leq 3 \times \sqrt{X_1} + X_2$ la differenza è accettabile con riserva

Se $|X_1 - X_2| > 3 \times \sqrt{X_1} + X_2$ la differenza è anomala

Se l'espressione data viene rispettata è possibile effettuare la media delle due prove per dare il valore, espresso come conteggi, nel campione in esame.

ESEMPIO: Supponiamo di avere riscontrato i seguenti valori in due prove consecutive indipendenti effettuate sullo stesso campione dallo stesso operatore $X_1 = 20$ e $X_2 = 29$; avremo che la differenza in termini numerici è 9 e la radice quadrata della somma è 7 (che è anche il valore dello scarto tipo di $(X_1 - X_2)$ secondo la distribuzione di Poisson).

Pertanto 9 è minore di $(2 \times 7) = 14$, quindi la differenza viene accettata.

ESEMPIO: Supponiamo di avere riscontrato i seguenti valori in due prove consecutive indipendenti effettuate sullo stesso campione dallo stesso operatore $X_1 = 17$ e $X_2 = 32$; avremo che la differenza in termini numerici è 15 e la radice quadrata della somma è 7 (che è anche il valore dello scarto tipo di $(X_1 - X_2)$ secondo la distribuzione di Poisson) pertanto 15 non è minore di $(2 \times 7) = 14$, ma è minore di $(3 \times 7) = 21$, quindi la differenza viene accettata con riserva.

ESEMPIO: Supponiamo di avere riscontrato i seguenti valori in due prove consecutive indipendenti effettuate sullo stesso campione dallo stesso operatore $X_1 = 13$ e $X_2 = 36$; avremo che la differenza in termini numerici è 23 e la radice quadrata della somma è 7 (che è anche il valore dello scarto quadratico medio di $(X_1 - X_2)$ secondo la distribuzione di Poisson).

Pertanto 23 non è minore di $(2 \times 7) = 14$, non è minore di $(3 \times 7) = 21$, ma è maggiore di $(3 \times 7) = 21$ quindi la differenza è anomala.

Tabella 1 (informativa) - Limiti dell'intervallo di confidenza a livello di significatività 95% del conteggio effettuato su una capsula di Petri.

Numero di microrganismi ¹⁾	Limite di confidenza		Errore percentuale ²⁾	
	inferiore	superiore	inferiore	superiore
1	< 1	6	- 97	+ 457
2	< 1	7	- 88	+ 261
3	< 1	9	- 79	+ 192
4	1	10	- 73	+ 156
5	2	12	- 68	+ 133
6	2	13	- 63	+ 118
7	3	14	- 60	+ 106
8	3	16	- 57	+ 97
9	4	17	- 54	+ 90
10	5	18	- 52	+ 84
11	6	20	- 50	+ 79
12	6	21	- 48	+ 75
13	7	22	- 47	+ 71
14	8	24	- 45	+ 68
15	8	25	- 44	+ 65

¹⁾ Equivalente al numero di colonie presenti

²⁾ Riferito al conteggio dei microrganismi della 1^a colonna

Versione on-line su sito www.iss.it

Tabella 2 (informativa) - Limiti dell'intervallo di confidenza a livello di significatività 95% del conteggio effettuato su due capsule di Petri

Numero di colonie ¹⁾	Numero di microrganismi	Limite di confidenza		Errore percentuale ²⁾	
		inferiore	superiore	inferiore	superiore
1	1	< 1	3	- 97	+ 457
2	1	< 1	4	- 88	+ 261
3	2	< 1	4	- 79	+ 192
4	2	1	5	- 73	+ 156
5	2	1	6	- 68	+ 133
6	3	1	6	- 63	+ 118
7	4	2	7	- 60	+ 106
8	4	2	8	- 57	+ 97
9	4	2	9	- 54	+ 90
10	5	2	9	- 52	+ 84
11	6	3	10	- 50	+ 79
12	6	3	10	- 48	+ 75
13	6	3	11	- 47	+ 71
14	7	4	12	- 45	+ 68
15	8	4	12	- 44	+ 65
16	8	5	13	- 43	+ 62
17	8	5	14	- 42	+ 60
18	9	5	14	- 41	+ 58
19	10	6	15	- 40	+ 56
20	10	6	15	- 39	+ 54
21	10	6	16	- 38	+ 53
22	11	7	17	- 37	+ 51
23	12	7	17	- 36	+ 50
24	12	8	18	- 36	+ 49
25	12	8	18	- 35	+ 48
26	13	8	19	- 35	+ 47
27	14	9	20	- 34	+ 46
28	14	9	20	- 34	+ 45
29	14	9	21	- 33	+ 44
30	15	10	21	- 32	+ 43

¹⁾ Conta totale su due capsule di Petri per lo stesso campione

²⁾ Riferito al valore di microrganismi della colonna 2

Bibliografia

ISO 7218:1996 - Microbiology of food and animal feeding stuff - General rules for microbiological examinations.

Microbiological Analysis of Food and Water: Guidelines for Quality Assurance, Lightfoot, N. F. and Maier, E. A. (eds.) 1998, Elsevier Science, Amsterdam.

Ottaviani M., L. Bonadonna. Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano. Metodi microbiologici. Rapporti ISTISAN 00/14, 2000, parte 2.

UNI CEI 9: Giugno 1997 - Guida all'espressione dell'incertezza di misura.

Water Quality - Guidance on Validation of Microbiological Methods, Technical Report ISO TR 13843:2000 International Standards Organisation, Geneva.