

VALIDAZIONE SECONDO LE NORME ISO ED UNI-ENV-ISO DEL METODO COLORIMETRICO QUANTITATIVO MBS CONTA DI COLIFORMI IN ACQUE SUPERFICIALI

Le metodiche sperimentali e le analisi statistiche che vengono applicate per saggiare la ripetibilità e riproducibilità del sistema analitico colorimetrico denominato Microbo Biosensori (MBS) sono quelle descritte nella Norma Internazionale ISO/TR 13843 (2000) "Water quality. Guidance on validation of microbiological methods".

- 1. Il metodo colorimetrico denominato Microbo BioSensori (MBS), mostra una risposta lineare a concentrazioni microbiche comprese tra 1×10^6 e < 10 CFU/ml.**
- 2. L'analisi statistica dimostra che la precisione e sensibilità del metodo colorimetrico MBS è paragonabile a quella ottenuta con il metodo delle conte su piastra.**
- 3. La ripetitività del metodo colorimetrico MBS è risultata superiore a quella del metodo delle conte su piastra.**

SPECIFICHE

- **Scopo e campo di applicazione** Validazione del metodo colorimetrico MBS in paragone al metodo delle conte su piastra per la rilevazione e conta differenziale di microorganismi totali e di coliformi in campioni di acqua superficiale
- **Robustezza dell'incubazione e sensibilita' al tempo** Le piastre per la conta delle CFU sono state osservate a 24, 36 e 48 ore.
- **Definizione degli organismi di riferimento:** Coliformi, definiti come gruppo di bacilli Gram negativi, negativi al test della ossidasi e positivi a quello della catalasi, resistenti agli acidi biliari e capaci di utilizzare il lattosio con formazione finale di acidi organici e gas. Alcuni coliformi sono in grado di crescere ad una temperatura di 44°C e quindi sono definiti coliformi termoresistenti.
- **Identificazione degli organismi di riferimento (coliformi)** Nella conta su piastra sono state considerate positive solo le colonie di colore rosso mattone visibili dopo 36 ore su terreno solido MacConkey (Peptone 17.0 g/l, Proteose Peptone 3.0 g/l, Lattosio 10.0 g/l, Bile Salts No.3 1.5 g/l, Cloruro di sodio 5.0 g/l, Agar 13.5 g/l, Rosso Neutro 0.03 g, Crystal Violet 1.0 mg/l). Nel metodo colorimetrico MBS e' stato considerato positivo il cambiamento di colore (rosso → giallo)
- **Limiti inferiore e superiore del protocollo sperimentale:** Campioni naturali di acqua superficiale contaminati con microorganismi fino a 1×10^6 CFU/ml con diluizione successive in brodo lattosato fino a 10^{-8} .
- **Recupero relativo:** I campioni sono stati contati alle diverse diluizioni con il metodo di confronto delle conte su piastra

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

È stato prelevato 1 litro di acqua dal Tevere. All'acqua è stato aggiunto 1 g di peptone e lasciata a temperatura ambiente in quanto lo scopo dell'esperimento era la validazione del metodo colorimetrico MBS, e non la determinazione esatta del contenuto di coliformi nell'acqua del Tevere. Il giorno seguente sono state effettuate le diluizioni (come descritto di seguito) e seminati gli inoculi con il reattivo Microbio Biosensori (MBS) per coliformi e su piastre di MacKonkey agar (terreno selettivo per coliformi).

Metodo colorimetrico MBS: Le fiale contenenti 9 ml di reattivo MBS per coliformi sono state inoculate con 1 ml di campione ed incubate a 44 °C ed osservate ad intervalli regolari ogni 30 minuti per osservare quando avvenisse l'eventuale cambiamento di colore (rosso-viola → giallo).

Figura 1: Aspetto delle fiale all'inizio della prova (colore rosso-viola) e dopo il cambiamento di colore (colore giallo)



Metodo della conta su piastra:

Le piastre sono state inoculate con 0.1 ml di campione (-1A, -1B, etc.) e sono state incubate in termostato a 44 °, eventualmente dopo ulteriore diluizione in PBS. La osservazione per la conta delle Unità Formanti Colonie (UFC) e' stata ripetuta a 24 e 36 ore, senza differenze significative.

Figura 2 Piastra di terreno solido MacConkey inoculata con coliformi e con altri microorganismi Gram negativi non coliformi (immagine da manuale DIFCO-BBL)

Piastra non inoculata: sezione in alto a sinistra

Coliformi (colonie positive): *Escherichia coli* in alto a destra.

Non coliformi (colonie negative) *Proteus mirabilis* in basso a sinistra e *Salmonella typhimurium* in basso a destra

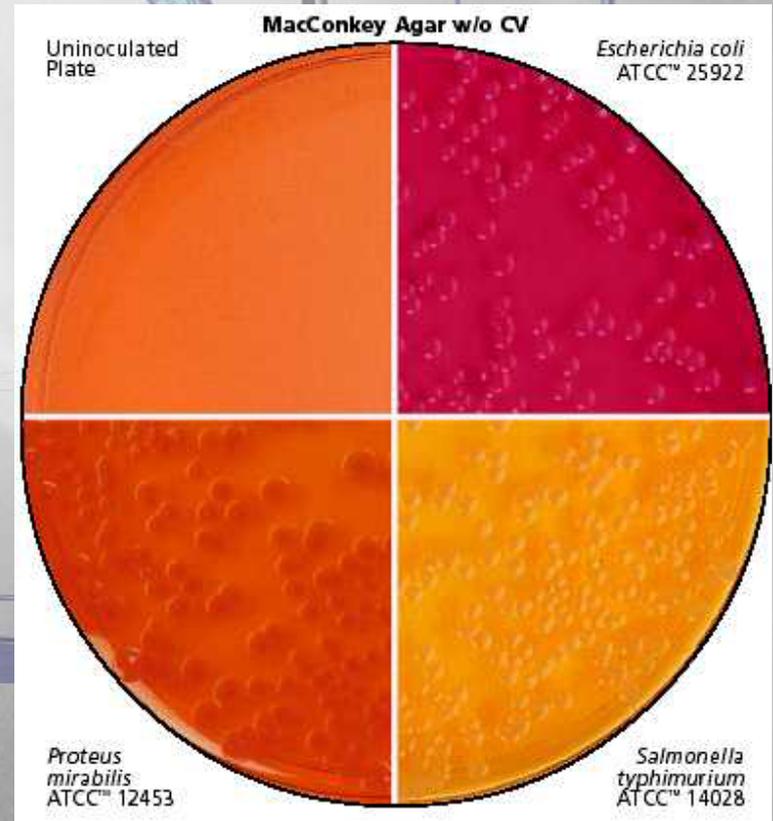


Figura 3: linearita' della risposta ottenuta mediante la conta su piastra delle CFU/ml.

Il logaritmo della conta su piastra delle CFU per ml e' stato messo in grafico contro la diluizione. La regressione lineare ha dato un alto valore di correlazione ($r=0.993$). La pendenza della retta (linea continua= 1.04) ha dato un valore vicino al valore teorico (linea tratteggiata= 1.00), probabilmente per una leggera sottostima alle diluizioni maggiori. Dalla regressione lineare si ricava anche la stima del contenuto iniziale del campione: $10^{(6.09)}=1.23e6$. Facendo la media delle conte (tenendo in considerazione le diluizioni) si ottiene : $1.05 \pm 0.46 e6$ (ovvero $\pm 43\%$).

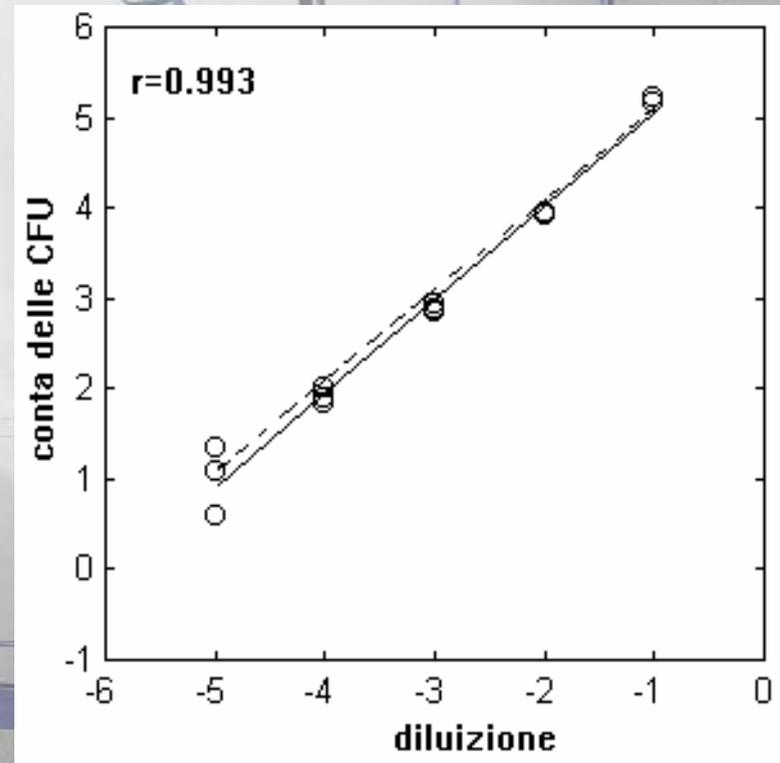


Figura 4: Retta di correlazione tra concentrazione di coliformi (espressa come log cfu/ml) e tempo occorso per il cambiamento di colore.

Notare la buona correlazione tra i tempi e le concentrazioni dei coliformi ($r=0.977$), La regressione lineare dei punti fornisce l'equazione della retta: $\log \text{CFU/ml} = 8.48 - 0.53 \times \text{tempo (ore)}$.

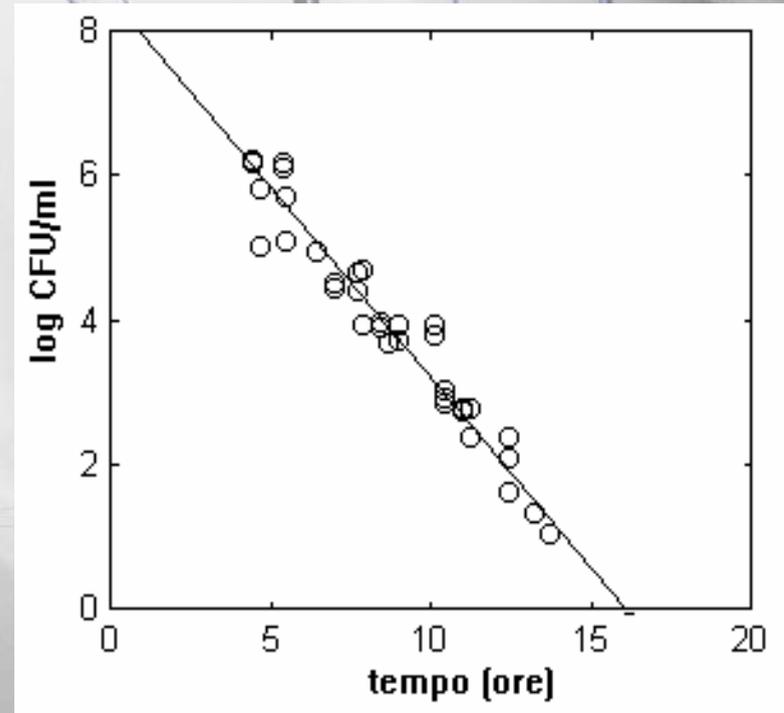
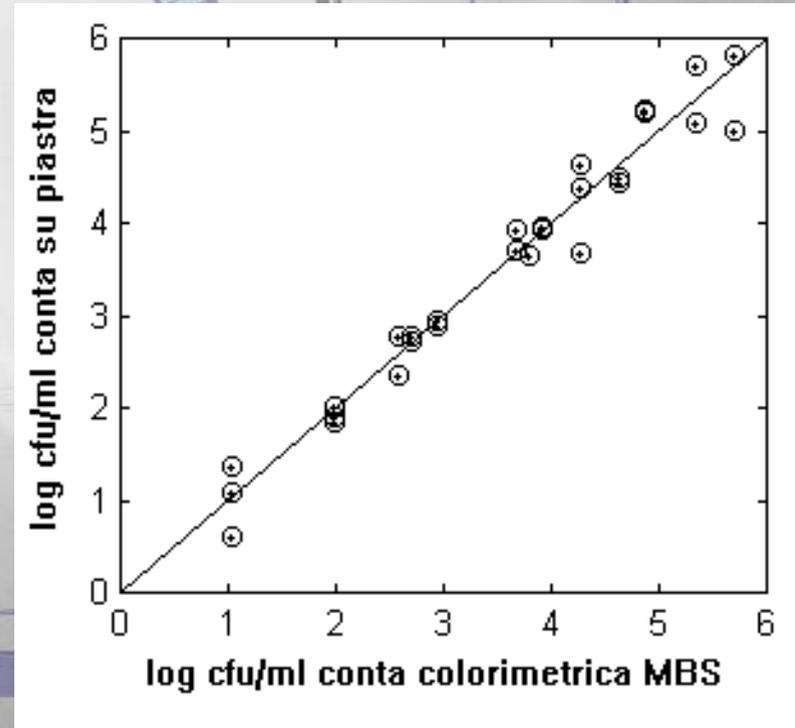


Figura 5: Paragone grafico tra i metodi

Il logaritmo delle conte su piastra delle CFU/ml ottenuti alle differenti diluizioni, e' stato messo in grafico rispetto al logaritmo della conta con metodo colorimetrico, espresso anch'esso come CFU/ml. Questo grafico permette una immediata visualizzazione della corrispondenza tra due metodi di analisi [13].

La linea retta rappresenta la corrispondenza tra le conte effettuate con il metodo della conta su piastra ed il metodo colorimetrico. Il valore ottenuto (1.005) e' molto vicino al valore teorico di completa corrispondenza (1.00). Inoltre, l'alto valore di correlazione ($r = 0.982$) indica una piccola dispersione dei punti sperimentali che risultano vicini alla retta.



ANALISI STATISTICA, ALLEGATO 1: ANALISI DELLA VARIANZA AD UN FATTORE (ANOVA TEST)

Paragone tra due tipi di analisi, considerando la diluizione per tutte le osservazioni effettuate.

Tabella della varianza

Sorgente della variazione	Gradi di liberta' (DF)	Somma dei quadrati (SS)	Media quadratica (MS=SS/DF)	valore di F (*/**)
tra i metodi	(2-1)=1	(A)= 2.612e-4	2.612e-4*	0.0147
tra le osservazioni	(30-2)=28	(C)= 0.4992	0.0178 **	
totale	(30-1)=29	(A+C=B)= 0.4995	0.0172	

$F(1,28)=0.0147$. Poiche' limite 1% per 1,28 gradi di liberta' = 4.17
le differenze tra i metodi non sono statisticamente significative

ANALISI STATISTICA, ALLEGATO 2: ANALISI DELLA VARIANZA A DUE FATTORI

Paragone tra due tipi di analisi, ciascuna provata a piu' diluizioni o su differenti campioni, usando piu' determinazioni per la stessa diluizione o per lo stesso campione

Tabella della varianza

sorgente della variazione	gradi di liberta' (DF)	somma dei quadrati (SS)	media quadratica (MS=SS/DF)	valore di F (*/**)
campioni (5)	4	0.0870 (S)	0.0217	
analisi (2)	1	2.66e-4 (M)	2.66e-2	
interazioni	4*1=4	8.58e-2 (I)	2.15e-2 *	0.264
errore	20	3.25e-1 (R)	1.63e-2 **	

Quindi $F(4,20)=0.264$. Poiche' limite 1% per 4,20 gradi di liberta'= 2.87
le differenze tra i metodi non sono statisticamente significative

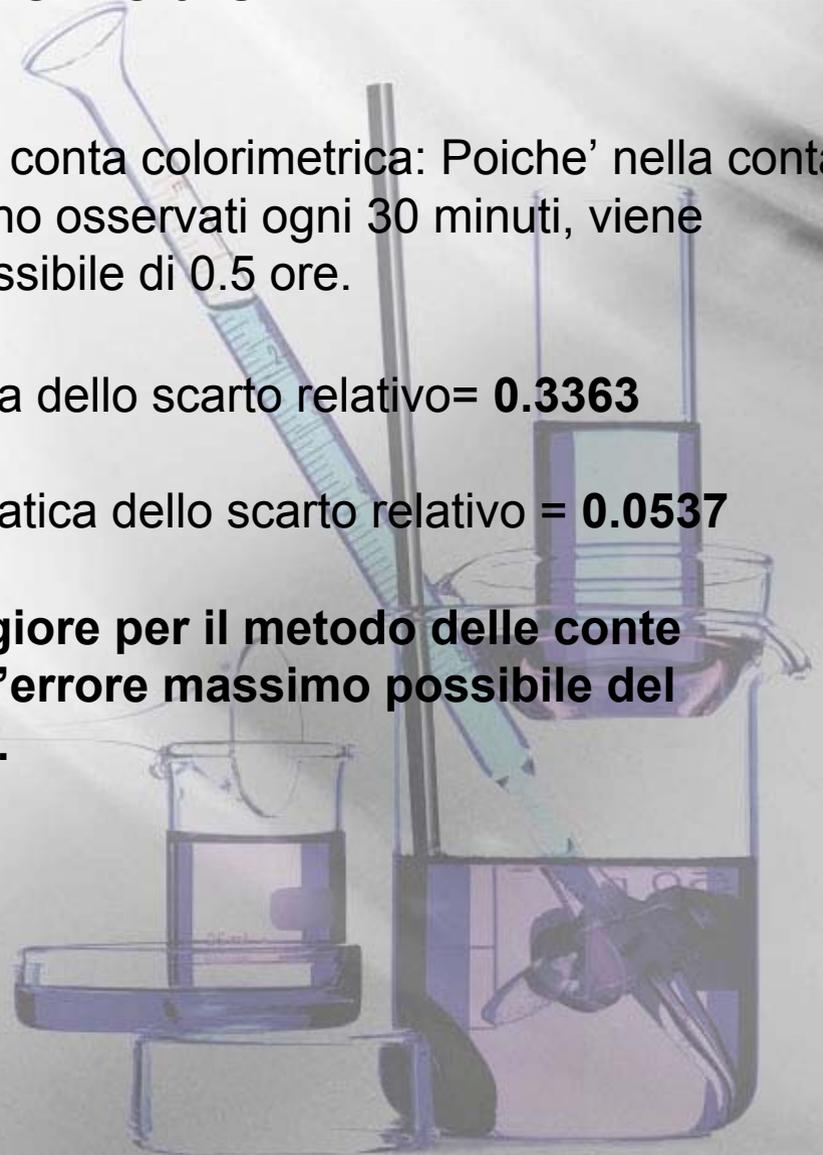
ANALISI STATISTICA, ALLEGATO 3: STIMA DELL'INCERTEZZA

Errore massimo possibile della conta colorimetrica: Poiche' nella conta colorimetrica i campioni vengono osservati ogni 30 minuti, viene assunto un errore massimo possibile di 0.5 ore.

Conta su piastra: Media quadratica dello scarto relativo= **0.3363**

Conta colorimetrica: Media quadratica dello scarto relativo = **0.0537**

L'incertezza sulla misura e' maggiore per il metodo delle conte su piastra, anche considerando l'errore massimo possibile del metodo colorimetrico (30 minuti).



RISULTATI

Precisione:

Analisi della varianza ad una via e dell'analisi della varianza a due vie per determinare la precisione del metodo colorimetrico MBS utilizzando come metodo di confronto il metodo delle conte su piastra.

Analisi della varianza: $F(1,28)=0.0147$. (limite 1% = 4.17)

Analisi della varianza a due vie: $F(4,20)=0.264$. (limite 1% = 2.87)

la precisione e sensibilita' del metodo colorimetrico MBS e' paragonabile a quella ottenuta con il metodo delle conte su piastra.

Stima dell'incertezza:

Analisi statistica della media quadratica dello scarto relativo (RDS):

Conta su piastra= 0.3363; Conta colorimetrica MBS: = 0.0537

La ripetitivita' del metodo colorimetrico MBS e' superiore a quella del metodo delle conte su piastra.

Limiti operativi affidabili

Il metodo colorimetrico MBS mostra una risposta lineare a concentrazioni microbiche comprese tra 1×10^6 e < 10 CFU/ml.



DALLA RICERCA LA VITA

La MBS srl nasce dalle ricerche originali sviluppate in collaborazione con l'Università "Roma Tre" e rappresenta la migliore dimostrazione delle potenzialità di trasferimento tecnologico di ricerche universitarie che hanno importanti ricadute anche nel campo economico e sociale.



L'ing. Alberto Mari è l'amministratore delegato.

Il prof. Giovanni Antonini (Ordinario di Biologia Molecolare dell'Università Roma Tre) è il direttore scientifico

Fanno parte del team di ricerca e sviluppo le dr.sse Serena Salvucci, Alessandra Capodaglio, Alessandra Antonini, Eleonora Lo Cicero, Francesca Romana Priolisi.

M.B.S. Srl

Polo Tecnologico Tiburtino
Via Giacomo Peroni 386,
00131 Roma - Italy
C.F. e P.I. 09423051003
REA 1162609,
tel +39.06.83767529
fax +39.06.40040364

info@emmebiesse.net
www.emmebiesse.net

MBS

MICROBIOLOGICAL
SURVEY

MBS-HACCP&ACQUE EASY TEST

**IL LABORATORIO
IN UNA PROVETTA**



E' possibile richiedere una confezione di prova di

MBS HACCP&ACQUE easy test a:

info@emmebiesse.net

oppure

tel 06. 83767529