



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÀ DI SCIENZE E TECNOLOGIE

Corso di laurea in
CHIMICA

*Studio e verifica di un metodo analitico per la
determinazione della microcistina-LR in matrice
acquosa*

Laureanda
Elisa FESTA
Matricola 941571

Relatore: Prof. Luigi FALCIOLA
Correlatore: Ing. Marieta HAHN

Anno Accademico 2021/2022

INDICE

1. Introduzione	2
1.1. Cianobatteri e cianotossine	3
1.2. Scopo.....	6
2. I metodi	8
2.1. Validazione e verifica di un metodo di prova	8
2.2. LC-MS	9
2.3. HPLC	10
2.4. Test immunoenzimatico ELISA	11
2.5. Confronto	14
3. Verifica del metodo di prova per il saggio ELISA.....	16
3.1 Dotazione di laboratorio	16
3.2 Reagenti	16
3.3 Procedura	17
3.4 Analisi	21
3.5 Risultati	43
4. Tecnica HPLC/UV	46
4.1 Reagenti, apparato HPLC, fase stazionaria e fasi mobili.....	46
4.2 Analisi.....	47
4.3 Risultati	51
5. Conclusioni.....	52
6. Ringraziamenti	54
7. Bibliografia	55

1. Introduzione

La proliferazione dei cianobatteri, anche noti come alghe verdi-azzurre, è diventato un problema sempre più consistente negli ultimi decenni. Questi microorganismi vanno a minare la qualità delle risorse idriche e conseguentemente anche il loro trattamento¹. Lo sviluppo di questi microorganismi è favorito in bacini lacustri, acque stagnanti, serbatoi naturali o bacini artificiali dove siano presenti un'elevata irradiazione solare, alte temperature, un basso grado di turbolenza delle acque e un'elevata quantità di sostanze nutritive^{2,3}. I cianobatteri producono cianotossine, ossia tossine algali dannose per la salute dell'uomo e degli animali. Oggigiorno sono state identificate quattro classi di cianotossine in base al sistema, organo, tessuto o cellula che colpiscono⁴ e vengono considerate sostanze pericolose prioritarie. Tra queste troviamo anatoxine, nodularine, saxitossine, cilindrospermopsina e microcistine.

Le microcistine sono epatotossine e sospetti cancerogeni⁴ prodotti da varie specie di cianobatteri, tra cui *Dolichospermum* (ex *Anabaena*), *Microcystis*, *Oscillatoria*, and *Planktothrix*¹. L'uomo entra in contatto con questi metaboliti tramite acque contaminate, acque potabili derivanti da risorse idriche in cui si registra una proliferazione di cianobatteri e la consumazione di pesce, crostacei e molluschi contaminati¹. Le microcistine sono eptapeptidi monociclici che contengono un amminoacido idrofobico, l'ADDA (acido 3-ammino-9-metossi-2,8,6-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienico). I congeneri di microcistine si differenziano a livello di due amminoacidi che conferiscono alla macromolecola differenti proprietà tossicologiche⁵. La variante maggiormente tossica e diffusa è la microcistina-LR (leucina-arginina)⁵⁻⁷. Al fine di proteggere la salute umana, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha fissato come linea guida la concentrazione di 1 µg/L di MC-LR nelle acque potabili⁸.

In collaborazione con l'azienda Acque Bresciane, è stato condotto il seguente studio al fine di validare una metodica di analisi per la microcistina-LR, in quanto nei prossimi anni è prevista l'entrata in vigore della Direttiva (UE) 2020/2184⁹, che fissa a 1.00 µg/L la concentrazione limite di MC-LR nelle acque destinate al consumo umano, ed in occasione di un imminente ampliamento dei loro laboratori, con conseguente possibile acquisto di strumentazione dedicata.

A tal fine sono state prese in considerazione tre diverse tecniche di analisi, già note all'azienda: LC-MS, HPLC-UV e saggio ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Queste sono state messe a confronto dal punto di vista teorico e/o sperimentale.

1.1. Cianobatteri e cianotossine

I cianobatteri sono organismi unicellulari procarioti fotosintetici. Il loro nome deriva dal greco “cianos” cioè “blu” ed è indicativo della loro colorazione, infatti, questi batteri vengono anche chiamati alghe blu-verdi². Si tratta di organismi ubiquitari che si sono adattati a sopravvivere in una vasta gamma di ambienti. Nonostante ciò, prediligono gli ambienti acquatici sia per quanto concerne le acque marine che i bacini d’acqua dolce³. La proliferazione di questi batteri è favorita da temperature superiori ai 20°C, da un elevato irraggiamento solare, da basse turbolenze delle acque e da elevate concentrazioni di nutrienti come azoto e fosforo che, oltre ad essere presenti naturalmente nell’ambiente, possono anche provenire da attività umane come l’uso di fertilizzanti e i deflussi agricoli, gli scarichi civili ed industriali^{2,3}.

La presenza di fioriture algali nocive di cianobatteri, ossia cyanobacterial harmful algal blooms, CyanoHABs, nelle acque superficiali destinate ad uso potabile e ricreativo è un problema emergente in tutto il mondo^{4,10}. Negli ultimi decenni, si sta assistendo ad un progressivo aumento dell’incidenza delle CyanoHABs, sia a livello di frequenza che di gravità delle conseguenze sull’uomo¹¹. Ciò ha scatenato un conseguente incremento degli studi e dei report pubblicati riguardo questa tematica, oltre a una maggiore consapevolezza del problema.

Le tossine algali sono metaboliti secondari prodotti dai cianobatteri e che possono costituire un rischio per la salute dell’uomo. Si distinguono in varie classi in base al loro meccanismo di azione³ e qui di seguito se ne presentano alcune.

- Anatossine (ANA): neurotossine prodotte da alcuni ceppi di *Anabaena* e specie come *Microcystis*, *Oscillatoria* (*Planktothrix*), *Cylindrospermum*, *Planktothrix formosa*, *Phormidium formosum*. Di questo gruppo fanno parte l’anatossina-a (Figura 1.1.1) e i suoi congeneri. Queste tossine si legano ai recettori nicotinici provocando la morte per blocco respiratorio entro pochi minuti dalla somministrazione³.

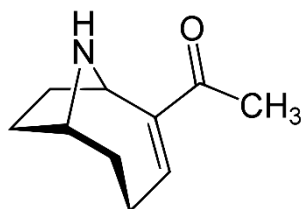


Figura 1.1.1 Struttura chimica dell’anatossina-a³

- Saxitossine (STX): neurotossine prodotte da diverse specie di cianobatteri come *A. circinales*, *Aphanizomenon* sp., *A. grazile*, *C. raciborskii*, *L. wollei*. Si tratta di alcaloidi carbammati, in

particolare sono tetraidropurine dotate di due gruppi guanidinici (Figura 1.1.2). Queste tossine formano un legame reversibile con i canali del sodio a potenziale dipendente, portando alla paralisi respiratoria e conseguente morte³.

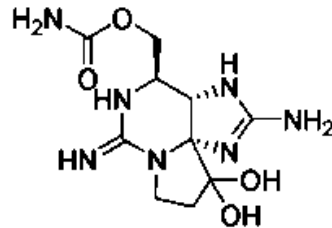


Figura 1.1.2 Struttura chimica delle saxitossine³

- Cilindrospermopsina (CYN): è un alcaloide ciclico guanidinico solfato (Figura 1.1.3). La cilindrospermopsina è una sostanza che porta citotossicità, epatotossicità e neurotossicità. La morte si verifica da 24 a 120 ore dopo l'esposizione. Viene prodotta da svariate specie di cianobatteri, tra cui la più pericolosa su scala globale risulta essere la *Cylindrospermopsis raciborskii*^{2,3}.

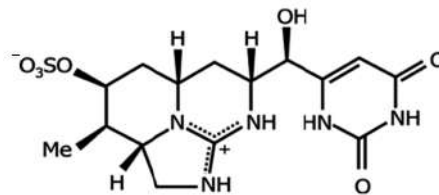


Figura 1.1.3 Struttura chimica della cilindrospermopsina³

- Microcistine (MC): sono eptapeptidi monociclici con struttura generale D-Ala-R1-D-β-MeAsp-R2-Adda-D-Glu-Mdha, dove R1 ed R2 rappresentano un L aminoacido variabile, D-β-MeAsp è l'acido D-eritro-β-metilaspartico, Mdha è l'N-metildeidroalanina e ADDA è l'acido (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-metossi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienoico (Figura 1.1.4). Sono stati individuati più di 240 congeneri di microcistine¹² che vengono classificati in base ai due amminoacidi variabili R1 e R2, infatti, la loro nomenclatura prevede la presenza della sigla MC seguita da un suffisso costituito dai codici a una lettera degli amminoacidi R1 e R2². I più comuni sostituenti R1 sono arginina (R), alanina (A) e metionina (M), mentre per R2 troviamo principalmente leucina (L), arginina (R) e tirosina (Z)³. Queste tossine sono prodotte da specie di cianobatteri quali *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Nostoc* e *Hapalosiphon*². Le microcistine colpiscono il tessuto epatico causando danni cellulari dovuti all'inibizione della proteina fosfatasi eucariotica di tipo 1 e 2A, causando una proliferazione cellulare senza regolazione³.

La microcistina-LR o MC-LR (Figura 1.1.5) è la variante più diffusa e tossica⁵⁻⁷. Per questo motivo l'OMS ha fissato come linea guida la concentrazione di 1 µg/L di MC-LR nelle acque potabili e ricreative⁸. Altri congeneri di microcistine che vengono generalmente monitorate sono dem-MC-LR, dem-MC-RR, MC-LA, MC-LF, MC-LW, MC-LY, MC-RR e MC-YR, dove dem significa che la posizione 9 dell'amminoacido ADDA è demetilata. La tossicità delle microcistine dipende fortemente dai due amminoacidi variabili R1 e R2. Le microcistine MC-LW e MC-LF provocano apoptosi degli astrociti già a basse concentrazioni e oltre alle proprietà neuro ed epatotossiche possono provocare sordità, tinnito e cecità intermittente^{13,14}. Sono stati effettuati vari studi sulle differenti tossicità delle microcistine e si è visto che per gli organismi acquatici il dato LC₅₀ (Letal Concentration per metà della popolazione in esame) segue il seguente andamento: MC-LR>MC-LY>MC-LW≈MC-LF¹⁵. I parametri di tossicità della microcistina-LR si individuano in un range di valori di LD₅₀ i.p. (Letal Dose per metà della popolazione in esame) di 50-150 µg/kg³.

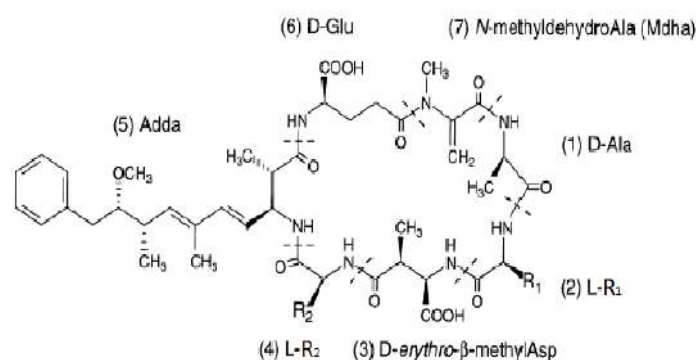


Figura 1.1.4 Struttura chimica delle microcistine¹⁶

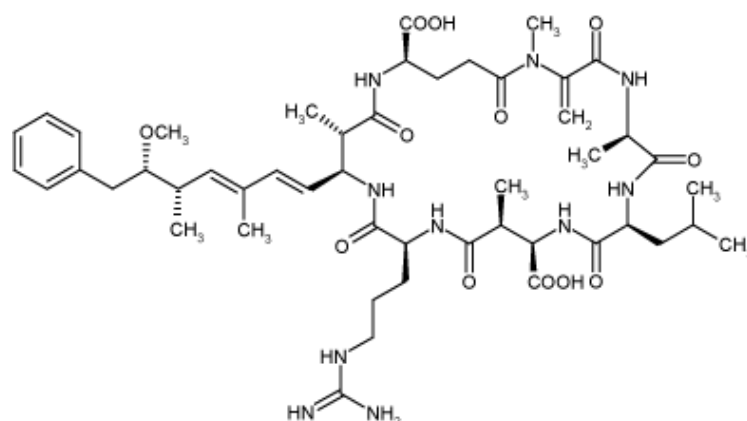


Figura 1.1.5 Struttura chimica della microcistina-LR¹⁷

- Nodularine: epatotossine prodotte dalla *Nodularia Spumigena* con struttura assimilabile a quella delle microcistine. Sono pentapeptidi monociclici con struttura generale D-MeAsp-L-

Arg-ADDA-D-Glu-Mdhh, con Mdhh che indica l'acido 2-(metilammino)-2- deidrobutilirrico (Figura 1.1.6). La loro tossicità è riconducibile a quella delle microcistine in quanto agiscono sempre sulle proteine fosfatasi eucariotiche di tipo 1 e 2A, ma queste tossine non vi formano legami covalenti³.

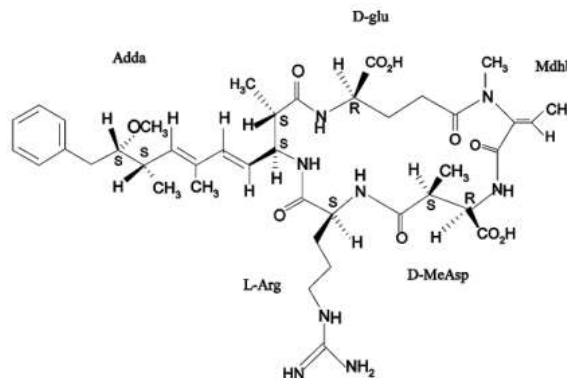


Figura 1.1.6 Struttura chimica delle nodularine²

Oltre a queste, sono note anche vari tipi di dermatotossine che possono promuovere dermatiti, infiammazioni e tumori cutanei².

Le cianotossine, in quanto metaboliti dei cianobatteri, si possono trovare disperse nella matrice in cui i batteri vivono (cianotossine extracellulari) e anche all'interno dei batteri stessi (cianotossine intracellulari)². Per quanto riguarda la matrice acquosa, il rischio di esposizione per l'uomo deriva dall'ingestione di acque contaminate o per contatto diretto con la pelle. Divengono quindi importanti il monitoraggio di acque potabili e acque superficiali destinate alla balneazione³. Per ovviare al problema delle CyanoHABs, che vanno a ridurre la qualità delle acque potabili indipendentemente dalla possibile presenza di cianotossine, sono stati individuati vari processi di rimozione dei cianobatteri. Questi mirano alla rimozione della cellula batterica senza provocarne la lisi, che potrebbe portare al riversamento di un'elevata quantità di tossine nelle acque sottoposte a trattamento. Tra i processi utilizzati si ricorre a sedimentazione, flocculazione, coagulazione, ozonizzazione, filtrazione a carboni attivi, nanofiltrazione, ultrafiltrazione, clorurazione, utilizzo di permanganato e disinfezione UV. Alcuni di questi processi però, come ozonizzazione e disinfezione UV, possono portare alla distruzione delle cellule ma non alla completa degradazione delle tossine¹¹.

1.2. Scopo

La provincia di Brescia è bagnata da fiumi come l'Oglio, il Mella e il Chiese, da tre laghi principali, Lago d'Iseo, Lago di Garda, Lago d'Idro, e innumerevoli laghi minori che costituiscono un'importante risorsa di approvvigionamento idrico. Questi bacini, a causa delle variazioni climatiche

causate dal fenomeno del riscaldamento globale e delle ingenti attività agricole ed industriali del territorio, sono potenzialmente soggetti a fenomeni di eutrofizzazione che possono andare a minare la qualità delle loro acque scatenando CyanoHABs. Nella Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 23 dicembre 2020 è stata pubblicata la nuova Direttiva (UE) 2020/2184⁹ sulla qualità delle acque destinate al consumo umano, che abroga la Direttiva 98/83/CE¹⁸, sulla quale si basava l'italiano D.Lgs. 31/2001¹⁹ applicato a tutte le acque destinate all'uso potabile, per la preparazione di cibi e bevande, sia in ambito domestico che nelle imprese alimentari, a prescindere dalla loro origine e dal tipo di fornitura. La nuova direttiva impone norme che mirano a proteggere la salute umana dagli effetti della contaminazione delle acque destinate al consumo umano. Secondo quanto riportato nella direttiva, articolo 25, punto 1 «Entro il 12 gennaio 2026 gli Stati membri adottano le misure necessarie a garantire che le acque destinate al consumo umano soddisfino i valori di parametro di cui all'allegato I, parte B» quindi, assecondando le linee guida presentate dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), è stata imposta una concentrazione limite non superiore ad 1 µg/L di MC-LR per le acque che presentino efflorescenze algali o nelle quali se ne noti un sensibile aumento⁸.

L'azienda Acque Bresciane è il gestore del ciclo idrico integrato della provincia di Brescia e tutela la qualità delle acque dei suoi bacini. Per questo motivo mira ad ottenere l'accreditamento di un metodo di prova per la determinazione quantitativa della microcistina-LR presente nelle acque destinate al consumo umano. Si parla di grandezze nell'ordine dei ppb; sono necessarie quindi tecniche altamente specifiche e sensibili per permettere un'identificazione univoca della MC-LR quanto più possibile libera da interferenze. Lo scopo di questo studio è individuare la metodica avete le prestazioni migliori per la valutazione del parametro microcistina-LR in matrice acquosa, con conseguente avviamento del processo di verifica del metodo di prova scelto, secondo le norme dell'ente di accreditamento ACCREDIA.

2. I metodi

2.1. Validazione e verifica di un metodo di prova

La validazione di un metodo di prova consiste nella dimostrazione delle prestazioni del metodo o della capacità di un laboratorio di applicare la suddetta metodica rientrando nei parametri prestazionali della stessa, portandone l'evidenza oggettiva. La verifica di un metodo si distingue dalla validazione in quanto viene applicata per l'adozione nel laboratorio di metodi normalizzati ossia emessi da organismi di normazione, ad esempio, metodi UNI, ISO, UNICHIM o da organismi pubblici autorevoli come EPA, APAT, IRSA o metodi non normalizzati validati da organismi di certificazione accreditati e consiste nella presentazione di un'evidenza oggettiva che un dato elemento soddisfi uno o più requisiti specifici²⁰.

Dopo essere stato sottoposto a validazione un metodo può essere accreditato ossia, come riportato nel documento di ACCREDIA RT-08, rev.05 del 15 Dicembre 2021, *“Prescrizioni per l’accreditamento dei laboratori di prova”*²¹, redatto in base alla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 *“Requisiti generali per la competenza dei Laboratori di prova e taratura”*²⁰, «L’accreditamento dimostra la competenza tecnica del Laboratorio ad effettuare le attività indicate nello scopo di accreditamento.»

Se il laboratorio mantiene i riferimenti al metodo ufficiale, normalizzato o non normalizzato, l’accreditamento può essere riconosciuto anche quando:

- vengono apportate modifiche migliorative delle prestazioni senza snaturare il principio o tecnica del metodo, se opportunamente verificate;
- si impiega il metodo fuori dal campo di misura, purché questa modifica venga sottoposta a una validazione;
- si impiega il metodo fuori dal campo di applicazione indicato se considerato equiparabile come, ad esempio, sfruttandolo per una matrice differente, purché questa modifica venga sottoposta a una validazione.
- si voglia ampliare l’impiego del metodo per determinare ulteriori parametri non previsti, previa validazione.

Per ottenere l’accreditamento per un metodo di prova, il laboratorio deve sottoporre il suddetto a un processo di validazione o verifica. Il laboratorio dell’azienda Acque Bresciane adotta metodi di prova già esistenti e validati; quindi, una volta scelto il metodo, procede solo a un processo di verifica dello stesso per ottenere l’accreditamento dell’analisi di un determinato parametro.

2.2. LC-MS

La tecnica LC-MS per l'analisi delle microcistine permette la simultanea separazione, identificazione e quantificazione di vari congeneri anche strutturali, avendo a disposizione le relative soluzioni standard¹⁰. Tra i tipi di microcistine identificabili troviamo dem-MC-RR, MC-RR, MC-YR, MC-LR, dem-MC-LR, MC-LA, MC-LY, MC-LF e MC-LW⁵. Generalmente viene utilizzata in combinazione con uno screening iniziale fatto tramite il saggio ELISA, seguito da uno step di concentrazione del campione tramite SPE (Solid-Phase Extraction). Il limite di rivelabilità di questa tecnica si trova in un intervallo compreso tra 0.002-0.1 µg/L in base a come viene effettuata la fase di SPE, al tipo di cromatografia liquida applicata (UHPLC o HPLC) e al tipo di spettrometria di massa o rivelatore utilizzato (spettrometria di massa tandem, QTOF, HRMS, ESI-MS/MS)²². L'utilizzo della spettroscopia MS/MS permette di ottenere un pattern di frammentazione di utilità maggiore per l'identificazione di microcistine incognite^{10,23} e consente di raggiungere LOD compresi tra 0.6 e 3.8 ng/L, rispetto alla rilevazione tramite il solo MS¹⁰. Secondo i metodi di prova ISTISAN^{5,6}, il campo di misura di questa tecnica è compreso tra 0.01 e 10 µg/L con valori di recupero percentuale superiori all'85% e una precisione di riproducibilità intralaboratorio espressa come deviazione standard relativa inferiore al 25% con un LOD nell'intervallo 0.002-0.025 µg/L per il metodo LC-MS/MS o inferiore al 10% con un LOD nell'intervallo 0.01-0.04 µg/L per il metodo LC-MS. I metodi sopracitati permettono l'analisi del contenuto di microcistine in campioni di acqua sia per la sola frazione extracellulare che per l'estrazione e l'analisi della frazione totale (extracellulare ed intracellulare) previa lisi cellulare. Secondo quanto riportato da Agilent Technologies Inc., utilizzando un metodo che prevede un Online SPE LC/MS/MS per l'analisi delle microcistine in matrice acquosa sono raggiungibili LOQ e LOD nell'ordine dei ng/L, quindi concentrazioni ben inferiori al limite previsto dalla Direttiva (EU) 2020/2184⁹, con recuperi compresi tra il 75 e il 110%²⁴.

Vedendo le caratteristiche prestazionali, questa tecnica è dotata della specificità e sensibilità necessarie per l'analisi di campioni di acqua potabile così come per l'analisi in matrici complesse e inusuali. Le limitazioni dell'LC-MS sono i costi elevati della strumentazione, i costi e la disponibilità di standard di riferimento e calibrazione, la necessità di avere personale specializzato, le lunghe tempistiche di preparazione del campione, analisi ed interpretazione dei risultati dovuti proprio all'elevata sensibilità e selettività della tecnica¹⁰. Nonostante ciò, la rilevazione attraverso spettrometria di massa porta a una maggiore selettività rispetto alla rivelazione UV e a una produzione di spettri significativi anche per concentrazioni di microcistine molto basse²³.

2.3. HPLC

La tecnica HPLC è molto utilizzata per analizzare le microcistine. La rivelazione dell'analita avviene attraverso spettroscopia di assorbimento UV-visibile o tramite l'utilizzo di un photo-diode array (PDA) a una lunghezza d'onda di 238 nm, ossia quella a cui si nota un massimo di assorbimento della radiazione ultravioletta per le microcistine. Microcistine contenenti triptofano mostrano picchi di massimo assorbimento a una lunghezza d'onda di 222 nm¹⁰. Generalmente prima di procedere all'analisi il campione deve essere sottoposto a un processo di pre-concentrazione tramite SPE o MSPE (magnetic solid-phase extraction), cosa che aumenta i costi di analisi a causa della grande quantità di solventi organici necessari durante le fasi di pretrattamento e desorbimento^{22,25}. Tutto ciò permette di raggiungere limiti di rivelabilità inferiori a 1 µg/L, rendendo il metodo adatto per la rilevazione della presenza di microcistine in campioni di acque¹⁰. Uno studio recente ha messo a punto un'ottimizzazione del metodo ISO 20179:2005²⁶ che prevede il cleanup e la pre-concentrazione dei campioni tramite SPE e rivelazione delle microcistine con HPLC-UV/PDA che ha portato al raggiungimento di un LOD di 0.1 µg/L con recuperi tra il 105 e il 118%¹. Tramite questa tecnica è possibile rilevare diverse varianti di microcistine presenti all'interno di un campione, avendo a disposizione un opportuno standard di raffronto per ciascuno dei congeneri che si desidera monitorare²². Purtroppo, questo è anche uno degli svantaggi del metodo in quanto resta limitato alla disponibilità commerciale di tali standard, nonché dai loro relativi costi. L'HPLC è di per sé una tecnica costosa, con tempistiche di analisi lunghe e necessita di un operatore esperto sia per lo svolgimento dell'analisi sia per quanto riguarda il cleanup del campione. Questa tecnica ha un altro svantaggio: non permette di distinguere tra le varianti strutturali di microcistine e inoltre microcistine tra loro simili possono co-eluire, rendendone difficile l'univoca rilevazione. Questa tecnica è estremamente dipendente da parametri come la fase mobile utilizzata, le condizioni di eluizione come il flusso e la temperatura per non parlare della scelta e delle capacità prestazionali della colonna cromatografica impiegata¹⁰. Questa metodica manca di specificità e gli spettri risultanti sono fortemente soggetti alle interferenze dovute alla matrice, alla presenza di altri analiti nonché di componenti organiche^{1,16}. Generalmente l'analisi viene condotta tramite un'eluizione in gradiente di acetonitrile e acqua ultrapura o miscele di acetonitrile e ammonio acetato. Gli eluenti vengono acidificati tramite TFA o acido formico^{1,16,27}. Dalle ricerche effettuate, per acidificare le fasi mobili si è scelto di utilizzare TFA invece che acido formico in quanto quest'ultimo sembra portare a una distorsione della baseline dello spettro a causa della sua alta assorbanza nella regione dell'ultravioletto. Le colonne cromatografiche principalmente utilizzate sono C₁₈, RP-C₁₈ e Amide C₁₆ a lunghezza e porosità variabile²⁷.

2.4. Test immunoenzimatico ELISA

L'Enzyme Linked Immunosorbent Assay o ELISA, è un test immunoenzimatico che si basa sul riconoscimento a livello qualitativo e quantitativo di una specifica biomolecola come un peptide, una proteina, un antigene, un anticorpo, un ormone o altro tramite l'utilizzo di anticorpi specifici, chiamati generalmente anticorpo primario e anticorpo secondario, all'interno di campioni biologici, miscele omogenee ed eterogenee. Uno dei suddetti anticorpi viene marcato tramite un enzima, generalmente perossidasi o fosfatasi alcalina, a formare un coniugato che possiede sia attività immunologica che enzimatica. La reazione tra l'antigene e l'anticorpo a formare un immunocomplesso viene evidenziata sfruttando il coniugato enzimatico. L'enzima, infatti, costituisce il generatore del segnale in quanto, in presenza di un opportuno substrato, catalizza una reazione colorimetrica o porta alla formazione di un composto in grado di emettere fluorescenza. Sfruttando questa serie di reazioni, l'antigene risulta rilevabile spettrofotometricamente tramite un lettore di micropiastre ELISA. Grazie all'interazione specifica antigene-anticorpo, questo saggio risulta estremamente sensibile, infatti, è in grado di rilevare anche concentrazioni di analita nell'ordine dei decimi di $\mu\text{g/L}$. Per questa ragione e considerando il limite previsto di $1.00 \mu\text{g/L}$ per la MC-LR, questa tecnica è stata presa in considerazione da questo studio. Per la rivelazione e la quantificazione delle microcistine, si sfrutta una curva di calibrazione logaritmica o semi-logaritmica, generata tramite l'utilizzo di standard a vari livelli di concentrazione.

Il test ELISA si svolge all'interno di micropiastre costituite da strip di pozzetti ossia la fase solida dell'analisi. La loro superficie viene sensibilizzata con una delle due componenti della reazione antigene-anticorpo. Esistono tre tipi di test ELISA: indiretto, diretto, che possono essere condotti anche in modalità a sandwich, e competitivo. Questi si distinguono per metodo di acquisizione e rilevamento.

L'ELISA indiretto (Figura 2.4.1) viene utilizzato per rivelare e quantificare la presenza di un anticorpo nel campione in analisi. Un antigene specifico viene immobilizzato alla fase solida e lo si fa reagire con il campione contenente l'anticorpo da quantificare. Si effettua un lavaggio volto a eliminare le sostanze non reagite e si aggiunge una soluzione di anticorpo secondario marcato con enzima, che riconosce come antigene l'anticorpo in analisi. Dopo un ulteriore lavaggio che elimina l'eccesso di anticorpo secondario, si aggiunge il substrato dell'enzima: l'attività enzimatica misurata sarà direttamente proporzionale alla quantità di anticorpo presente nel campione.

Contrariamente, l'ELISA diretto (Figura 2.4.1) viene utilizzato per rivelare e quantificare la presenza di un antigene all'interno del campione in analisi. L'antigene viene immobilizzato sulla fase solida e

si fa reagire con un anticorpo primario marcato con un enzima. Successivamente al lavaggio che elimina l'eccesso di anticorpo, si aggiunge il substrato dell'enzima e l'attività enzimatica misurata sarà direttamente proporzionale alla quantità di antigene presente.

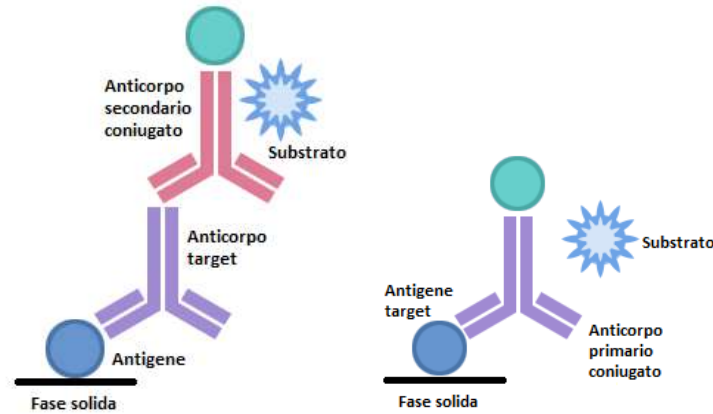


Figura 2.4.1 - ELISA indiretto (sinistra) e diretto (destra)²⁸

Esistono anche le tecniche sandwich ELISA diretto e indiretto (Figura 2.4.2). Nel caso del sandwich diretto, si rileva e quantifica la presenza di uno specifico antigene avente due siti antigenici. Un anticorpo specifico legato alla fase solida lega l'antigene presente nel campione e, previo lavaggio, l'immunocomplesso immobilizzato viene messo a contatto con un secondo anticorpo enzima coniugato che riconosce il secondo sito antigenico. La misura dell'attività enzimatica sarà direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene da stimare. La tecnica sandwich ELISA indiretto si distingue dalla precedente in quanto il secondo anticorpo non viene marcato e si sfrutta successivamente un terzo anticorpo enzima coniugato in grado di legarsi al secondo. Anche in questo caso l'attività enzimatica è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene presente nel campione.

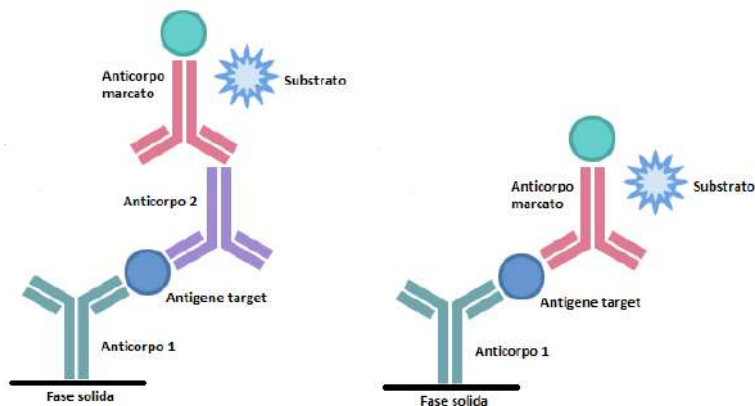


Figura 2.4.2 – ELISA Sandwich indiretto (sinistra) e diretto (destra)²⁸

Nello specifico dell'analisi delle microcistine, ci troviamo di fronte a un saggio competitivo che viene chiamato ELISA-ADDA in quanto la sua molecola target è l'omonimo amminoacido precedentemente citato.

Il saggio ELISA di tipo competitivo (Figura 2.4.3) si basa su un meccanismo di competizione-inibizione. L'anticorpo primario può legarsi a formare un immunocomplesso alternativamente con l'analita presente nel campione e con l'antigene analogo all'analita immobilizzato sulla superficie del pozzetto; l'analita nel campione sottrae molecole di anticorpo alla formazione dell'immunocomplesso tra anticorpo e antigene immobilizzato. Conseguentemente, maggiore sarà la concentrazione di analita nel campione, minore sarà la quantità di anticorpo primario che si legherà alla superficie del pozzetto. A questo punto, si effettua un lavaggio dei pozzetti volto a rimuovere l'immunocomplesso analita-anticorpo presente in soluzione. Si procede all'aggiunta dell'anticorpo secondario enzima-coniugato, che si lega all'immunocomplesso immobilizzato al pozzetto. Dopo un secondo lavaggio, che elimina l'eccesso di coniugato enzimatico, si sfrutta una soluzione di sviluppo contenente il substrato dell'enzima per scatenare una reazione colorimetrica. La soluzione contenuta nei pozzetti assume una colorazione blu, la cui intensità è inversamente proporzionale alla concentrazione di analita presente nel campione. La reazione viene bloccata dopo un ben preciso periodo di tempo da una soluzione di stop e si assiste a un viraggio della colorazione da blu a giallo²⁹⁻

31.

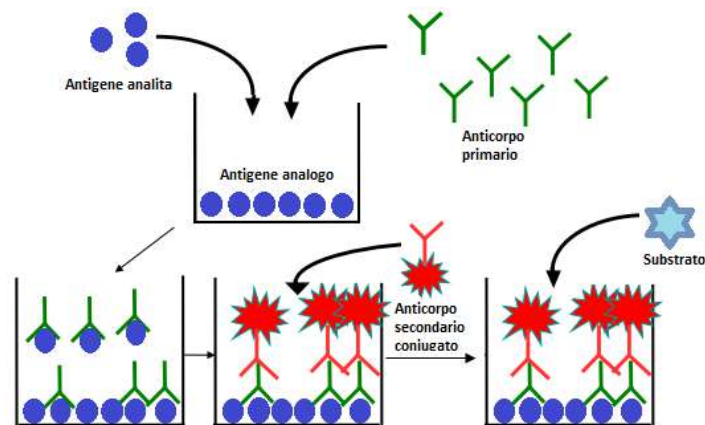


Figura 2.4.3 – ELISA competitivo³¹

Il saggio ELISA è altamente specifico, sensibile e veloce da eseguire ed è utile per effettuare un primo screening al fine di rilevare la presenza di microcistine¹⁰. Grazie alla sua elevata sensibilità, per l'identificazione delle tossine è necessaria solo una piccola quantità di campione, generalmente pochi microlitri, con una manipolazione minima se non addirittura assente del campione¹². In generale, l'ELISA è una tecnica che gode di ripetibilità, riproducibilità e variabilità dei risultati per le

concentrazioni di microcistine rispetto ad altri metodi¹⁰. Inoltre, i limiti di rivelabilità sono spesso inferiori al valore della linea guida proposta dall'OMS (tra 0.1 e 0.15 µg/L⁷). Il saggio ELISA per la rivelazione e quantificazione della microcistina-LR ha un campo di misura pari all'intervallo 0.15-5.00 µg/L¹⁰ che in sé risulta essere molto limitato, ma comunque adatto se si considera la direttiva⁹. Questa tecnica risulta più adatta per l'analisi di grandi quantità di campioni rispetto alle tecniche a spettrometro di massa o con strumentazione HPLC grazie alla configurazione a 96 pozzetti delle micropiastre. Di contro, però, ha il fatto di essere una tecnica che richiede una spesa ingente a livello di costi per attrezzature e tempistiche di interpretazione dei risultati, nonché l'impiego di personale formato, specializzato e abilitato. Il test ELISA non è adatto per effettuare analisi di speciazione delle microcistine in quanto non è in grado di distinguerne i congeneri, siccome si basa sul riconoscimento del comune amminoacido ADDA¹⁰. I risultati del saggio vengono espressi in equivalenti di MC-LR.

2.5. Confronto

Confrontando le tecniche HPLC, LC-MS ed ELISA si ottengono risultati generalmente in accordo tra loro^{16,32}. L'ELISA risulta meno dispendiosa a livello economico rispetto alle altre due tecniche, ma comunque tutte prevedono tempistiche di analisi lunghe e l'impiego di personale specializzato. L'ELISA è una tecnica utile per il monitoraggio della presenza di microcistine in matrice acquosa grazie alla sua elevata sensibilità e specificità ed è in grado di rivelare la quantità totale di microcistine presenti nel campione. Nonostante ciò, non permette di fare speciazione contrariamente alle tecniche HPLC e LC-MS. Tutte le tecniche richiedono l'utilizzo di standard per effettuare l'identificazione e la quantificazione dell'analita e in particolare l'HPLC e l'LC-MS necessitano di tutti gli standard dei vari congeneri delle tossine che si vogliono rilevare, ma hanno il vantaggio di essere meno influenzate dalle interferenze della matrice^{10,22}. La tecnica HPLC non è in grado di differenziare tra le varianti strutturali di microcistine come l'LC-MS. La tecnica LC-MS è quella che permette di raggiungere limiti di rivelabilità e di quantificazione inferiori.

Alla luce di ciò, la tecnica LC-MS risulta essere la più adatta agli scopi di questo studio. Non avendo a disposizione la strumentazione adatta per valutare le prestazioni di un metodo di prova per la tecnica LC-MS, sono state effettuate misurazioni solo con le tecniche HPLC ed ELISA. Per quanto riguarda l'ELISA, considerando quanto detto in precedenza e in base alla compatibilità con il kit già in uso dall'azienda, vista la variabilità di risultati ottenibili e tenuto conto dei criteri di accettabilità stringenti dati dal metodo di prova, è stato scelto di adottare il metodo Ohio EPA Method 701.0 Version 2.4, 2021³³ e si è proceduti con la verifica di questo metodo. Per il metodo HPLC, dato che l'azienda aveva a disposizione strumentazione dedicata, secondo la normativa UNI CEI EN ISO-IEC

17025-2018²⁰, non si è potuti procedere con una verifica del metodo, ma sono state condotte delle prove di valutazione delle prestazioni della tecnica usufruendo della strumentazione dei laboratori di ricerca dell'Università Statale di Milano.

3. Verifica del metodo di prova per il saggio ELISA

3.1 Dotazione di laboratorio

- Bottiglie di vetro scuro da 100 mL;
- Cappa Thermo Scientific MSC Advantage 1.8;
- Micropipetta Eppendorf monocanale capacità 1 – 100 μ L;
- Micropipetta Eppendorf multicanale capacità 30 – 300 μ L;
- Vaschette per reagenti per pipetta multicanale;
- ChroMate™ Lettore di micropiastre ELISA;
- Vials di vetro ambrato 4,0 mL con tappo a vite;
- Parafilm;
- Alcol denaturato come liquido disinfettante;
- Carta assorbente di laboratorio;

3.2 Reagenti

- Contenuto di Eurofins Abraxis Microcystins/Nodularins (ADDA) ELISA Kit (conservato a una temperatura di $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, come i campioni):
 - Micropiastra con pozzetti (12 strisce per 8 pozzetti) ricoperti con un analogo di microcistine coniugate ad una proteina;
 - Standards: 0, 0.15, 0.40, 1.0, 2.0, 5.0 $\mu\text{g/L}$, ciascuno da 1.0 mL;
 - Controllo: $0.75 \pm 0.185 \mu\text{g/L}$, da 1.0 mL, preparato da una fonte secondaria, da usare come Quality Control Standard (QCS);
 - Diluente per i campioni, 25 mL per la diluizione di campioni che risultano al di fuori del range della curva di calibrazione degli standard;
 - Antisiero (Antibody Solution), specifico anti-microcistine, 6 mL;
 - Coniugato enzimatico (Anti-Sheep-HPR Conjugate Solution), 12 mL;
 - Soluzione di sviluppo (Substrate Solution), 12 mL;
 - Soluzione di Stop (Stop Solution), 6 mL;
 - Soluzione di lavaggio (Wash Buffer Conc. 5X), 100 mL, da diluire prima dell'uso.

- Contenuto Eurofins Abraxis QuikLyse™:
 - Lysis Reagent A, 2 vial di vetro ambrato da 2.5 mL ciascuno;
 - Lysis Reagent A, 1 vial di vetro ambrato da 0.5 mL;
 - 45 pipette monouso;
 - 45 puntali filtranti.
- Tiosolfato di sodio: agente di dechlorazione (usato per l'acqua potabile).
- Acqua ultrapura grado 2 sterile: acqua deionizzata purificata con sistema Milli-Q® (Millipore). La qualità di questo deve soddisfare una resistività minima di 10,0 MΩ.
- Standard di MC-LR 9.707 ± 0.020 µg/L in metanolo acquistato da Merck.

3.3 Procedura

Vista la sensibilità del saggio e dato che le microcistine sono tossine, a parte per i passaggi relativi ai lavaggi, l'ELISA-ADDA si esegue sotto cappa microbiologica previa disinfezione dell'ambiente di lavoro tramite un liquido disinfettante come alcol denaturato.

Il saggio ELISA è stato effettuato tramite l'utilizzo del kit Eurofins Abraxis Microcystins/Nodularins (ADDA) ELISA Kit contenete una micropiastra da 96 pozzetti totali, sensibilizzati tramite l'utilizzo di un antigene analogo delle microcistine. Il kit ha un campo di misura pari a 0.15-5.00 µg/L e un LOD pari a 0.10 µg/L. Per ogni batch analizzato, viene costruita una curva di calibrazione sfruttando sei soluzioni standard a concentrazioni di 0, 0.15, 0.40, 1.00, 2.00 e 5.00 µg/L fornite dal produttore del kit. Lo standard 0 µg/L non costituisce un punto della curva di calibrazione. Per ogni saggio condotto, oltre agli standard e ai campioni, devono sempre essere analizzati:

- Diluente per campioni (Laboratory Reagent Blank - LBR): un'aliquota del diluente che deve essere sottoposta alla stessa procedura di trattamento dei campioni, analizzata per verificare l'assenza di contaminanti. Questa è la soluzione utilizzata in caso sia necessario diluire i campioni se questi risultano avere una concentrazione maggiore del limite superiore del campo di misura. Se nel batch sono presenti acque potabili, l'LBR deve contenere tiosolfato. Se il valore ottenuto è maggiore di 0.15 µg/L è necessario rianalizzare l'intera micropiastra. Non è possibile analizzare il diluente per campioni fornito dal kit in utilizzo. Nelle analisi di questo studio, come LBR è stata utilizzata acqua ultrapura grado 2 sterile.

- Low Calibration Range Check (LCRC): un punto della retta di calibrazione con concentrazione compresa tra l'LOQ e 0.50 µg/L che deve essere analizzato per verificare l'accuratezza della curva di calibrazione vicino all'LOQ. Il valore viene considerato accettabile se rientra entro $\pm 40\%$ del valor vero, altrimenti è necessario ripetere l'analisi dei campioni con concentrazioni inferiori a quelle di un Controllo (QCS) accettabile presente nella medesima analisi. La soluzione utilizzata in queste analisi corrisponde allo standard 0.40 µg/L fornito dal produttore del kit. Sono accettabili valori che rientrano nell'intervallo 0.40 ± 0.16 µg/L.
- Controllo (QCS): necessario per verificare l'esattezza e la precisione della curva di taratura. Affinché l'analisi sia accettabile il controllo deve avere una concentrazione pari a 0.75 ± 0.185 µg/L. In caso si ecceda il limite di accettabilità, l'analisi va ripetuta per i campioni che hanno una concentrazione maggiore di un LCRC accettabile.

Campioni e soluzioni standard vengono analizzate in doppio, in due pozzetti affiancati. Un batch di analisi risulta quindi composto nel modo seguente (Figura 3.3.1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std 0	Std 0	Camp. 2	Camp. 2								
B	Std 0.15	Std 0.15	ecc.	ecc.								
C	Std 0.40	Std 0.40	LBR	LBR								
D	Std 1.0	Std 1.0	LCRC	LCRC								
E	Std 2.0	Std 2.0										
F	Std 5.0	Std 5.0										
G	Contr.	Contr.										
H	Camp. 1	Camp. 1										

Figura 3.3.1 – Template analisi ELISA

La lettura dell'assorbanza di ogni pozzetto è stata effettuata tramite il lettore di micropiastre Chromate™ ad una lunghezza d'onda di 450 nm, con un filtro secondario posto a 630 nm. Tramite il software Chromate Manager ed Microsoft Office Excel si è calcolato il valore medio di assorbanza delle coppie di pozzetti. Per ciascuno di questi valori viene calcolata $\%B/B_0$, dividendo l'assorbanza media per l'assorbanza media dello standard 0 µg/L. Con i risultati dati dagli standard viene costruita una curva di calibrazione punto-a-punto in scala logaritmica lungo l'asse delle ascisse del tipo $\log(C)$ vs $\%B/B_0$, dove C corrisponde alla concentrazione dello standard in µg/L. Tramite interpolazione sulla curva di calibrazione dei valori $\%B/B_0$, viene restituita la concentrazione di microcistine totali nei controlli e nei campioni come equivalenti di MC-LR. Se il valore di assorbanza medio risulta maggiore di quello trovato per lo standard 0.15 µg/L, viene restituito il valore " $< 0,15$ ". Se il valore

di assorbanza medio risulta minore di quello trovato per lo standard 5.00 µg/L, viene restituito il valore “>5”.

Per essere ritenuta accettabile, l’analisi deve rispettare i seguenti parametri di controllo qualità indicati nel metodo Ohio EPA 701.0 Version 2.4, 2021³³.

- Il Coefficiente di Variazione (%C.V.) degli standard di calibrazione e del QCS deve essere $\leq 10.0\%$. L’analisi è considerata accettabile anche se solo uno standard o un QCS ha un %C.V. compreso tra il 10.0% e il 15.0%. Lo standard zero è escluso da questo requisito. Il %C.V. è calcolato come di seguito:

$$\%C.V. = (SDA/Media_A) \cdot 100$$

$Media_A$ = media delle assorbanze dei pozzetti analizzati in doppio

SDA = deviazione standard dei pozzetti analizzati in doppio

- Il %C.V. dei campioni deve essere $\leq 15.0\%$. Se il valore di un qualsiasi campione è $>15.0\%$ è necessario rianalizzarlo.
- Secondo quanto riportato nel metodo, il Coefficiente di Correlazione (R^2) della retta di calibrazione deve essere ≥ 0.980 . In questo caso, però, viene utilizzata una curva di calibrazione punto-a-punto. Conseguentemente questo parametro non è stato preso in considerazione per l’effettiva verifica del metodo, in quanto quella cui ci si trova di fronte non può essere considerata una retta, ma verrà comunque presentato all’interno di questo studio.
- Se l’analisi del campione determina che esso ha una concentrazione maggiore rispetto al campo di misura, il campione deve essere diluito con l’LBR e rianalizzato.

Il metodo scelto prevede l’analisi delle microcistine totali (extracellulari e intracellulari) presenti nei campioni quindi, prima dell’analisi tramite ELISA, su questi si è svolta la lisi cellulare sfruttando il kit Eurofins Abraxis QuikLyse™.

Di seguito si riporta la procedura del saggio ELISA.

- a. Lasciare che il contenuto del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente prima di procedere con l’analisi.

- b. Utilizzando la micropipetta Eppendorf monocanale, aggiungere 50 μL delle soluzioni standard, del controllo, dei campioni, dell'LRB e dell'LCRC in ciascuno dei rispettivi pozzetti, seguendo quanto indicato su un opportuno template.
- c. Utilizzando la micropipetta Eppendorf multicanale, aggiungere 50 μL dell'antisiero in ciascuno dei pozzetti.
- d. Controllare l'assenza di bolle e in caso eliminarle con l'aiuto di un puntale pulito. Coprire la micropiastra con parafilm e mescolare effettuando movimenti basculanti per 30 secondi. Incubare le strisce per 90 minuti a temperatura ambiente e protette dalla luce solare.
- e. Rimuovere la copertura, svuotare il contenuto dei pozzetti ed effettuare tre lavaggi dei pozzetti con la soluzione di lavaggio presente nel kit. Ad ogni lavaggio svuotare il contenuto dei pozzetti. Utilizzare almeno 250 μL di soluzione di lavaggio controllando di riempire i pozzetti con una uguale quantità di soluzione ed evitare la formazione di bolle.
- f. Avvolgere la micropiastra nella carta assorbente e sbatterla vigorosamente su una superficie piana fino a che l'interno dei pozzetti non sia completamente asciutto, controllando che nei pozzetti non siano rimasti residui di soluzione di lavaggio.
- g. Utilizzando la micropipetta Eppendorf multicanale, aggiungere 100 μL di coniugato enzimatico in ciascuno dei pozzetti.
- h. Controllare l'assenza di bolle e in caso eliminarle con l'aiuto di un puntale pulito. Coprire la micropiastra con parafilm e mescolare effettuando movimenti basculanti per 30 secondi. Incubare le strisce per 30 minuti a temperatura ambiente, protette dalla luce solare, e rispettando esattamente questa tempistica.
- i. Ripetere gli step di lavaggio e asciugatura descritti ai punti *e* ed *f*.
- j. Utilizzando la micropipetta Eppendorf multicanale, aggiungere 100 μL di soluzione di sviluppo in ciascuno dei pozzetti. Si nota lo sviluppo di una colorazione azzurro/blu.
- k. Controllare l'assenza di bolle e in caso eliminarle con l'aiuto di un puntale pulito. Coprire la micropiastra con parafilm e mescolare effettuando movimenti basculanti per 30 secondi. Incubare le strisce riparandole dalla luce per 20-30 minuti a temperatura ambiente. Se il kit in uso non è stato aperto di recente, è consigliabile incubare per 30 minuti.
- l. Utilizzando la micropipetta Eppendorf multicanale, aggiungere 50 μL della soluzione di stop in ciascuno dei pozzetti. Si osserva il viraggio della soluzione dal colore azzurro/blu a giallo.

- m. Leggere l'assorbanza a 450 nm utilizzando il lettore di micropiastre ChroMate™ entro e non oltre 15 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop.

3.4 Analisi

La verifica del metodo di prova è stata eseguita secondo quanto riportato nei Manuali UNICHIM 179/0-3:2011, nella guida EURACHEM “The fitness for purpose of analytical method” II° ed. 2014, ARPA Emilia-Romagna “Linee guida per la validazione di metodi analitici e per il calcolo dell'incertezza di misura” 2002, nei Documenti ACCREDIA DT-0002, DT-0002/3,4,6 e RT-08^{21,34-43} e sono stati valutati i seguenti parametri:

- Limite di rivelazione (LOD);
- Limite di quantificazione (LOQ);
- Precisione (ripetibilità e/o riproducibilità);
- Errore sistematico (BIAS);
- Esattezza e recupero;
- Campo di Misura;
- Linearità;
- Incertezza di misura.

Per ciascuno dei parametri sono state effettuate circa dieci prove ripetute su campioni inquinati con standard di microcistine o sugli stessi standard, andando a calcolare media delle concentrazioni ottenute e lo scarto tipo sugli stessi.

Oltre a queste prove, sono state effettuate in maniera analoga una prova su dei bianchi, per verificare la presenza di possibili interferenze dovute alla strumentazione e ai materiali utilizzati per l'analisi, una prova per verificare l'assenza contaminazione reciproca tra pozzetti adiacenti, prove di lettura delle assorbanze a tempi di 0, 5, 10, 15 minuti dopo la terminazione dell'analisi, prove di confronto su campioni lisati e campioni tal quali per valutare la presenza di interferenze dovute ai reagenti usati per la lisi. In tutte le prove, come bianco è stata utilizzata acqua ultrapura grado 2 sterile, come fatto anche per l'LBR.

Al fine di calcolare l'LOD, sono state effettuate sette prove ripetute su uno standard a concentrazione 0.40 µg/L, secondo quanto riportato nel metodo Ohio EPA 701.0 version 2.4, 2021³³.

$$\text{LOD} = t \cdot \sigma \quad (3.4.1)$$

$t = 3.143$ coefficiente t di Student con un livello di confidenza del 99% e 6 gradi di libertà.

σ : deviazione standard delle repliche in analisi.

LOD risulta accettabile secondo il metodo se risulta inferiore all'LOQ, non eccede la concentrazione dello standard utilizzato per effettuare la misurazione e non risulta più di dieci volte inferiore alla concentrazione dello standard utilizzato.

Di seguito si riportano i risultati ottenuti (Tabelle 3.4.1-2, Figura 3.4.1)

Tabella 3.4.1 – Standard di calibrazione, misura LOD

$C_{Std} / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	O.D. 1	O.D. 2	Media	C.V. (%)	B/Bo (%)
0	1.992	2.040	2.016	1.684	-
0.15	1.879	1.790	1.835	3.430	90.997
0.40	1.399	1.500	1.450	4.927	71.900
1.00	1.261	1.143	1.202	6.942	59.623
2.00	1.032	0.967	1.000	4.598	49.578
5.00	0.752	0.765	0.759	1.212	37.624

Tabella 3.4.2 – Campioni, misura LOD

Campione	Descrizione campione	O.D.1	O.D.2	Media	C.V.(%)	B/Bo (%)	$C / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
1	Controllo	1.253	1.199	1.226	3.114	60.813	0.915
2	std 0.40 $\mu\text{g}/\text{L}$	1.429	1.511	1.470	3.944	72.917	0.380
3	std 0.40 $\mu\text{g}/\text{L}$	1.436	1.450	1.443	0.686	71.577	0.410
4	std 0.40 $\mu\text{g}/\text{L}$	1.442	1.419	1.431	1.137	70.957	0.429
5	std 0.40 $\mu\text{g}/\text{L}$	1.516	1.405	1.461	5.374	72.445	0.389
6	std 0.40 $\mu\text{g}/\text{L}$	1.397	1.423	1.410	1.304	69.940	0.463
7	std 0.40 $\mu\text{g}/\text{L}$	1.552	1.486	1.519	3.072	75.347	0.335
8	std 0.40 $\mu\text{g}/\text{L}$	1.598	1.401	1.500	9.290	74.380	0.352
9	LBR	1.857	1.833	1.845	0.920	91.518	< 0,15
10	LCRC	1.331	1.411	1.371	4.126	68.006	0.535

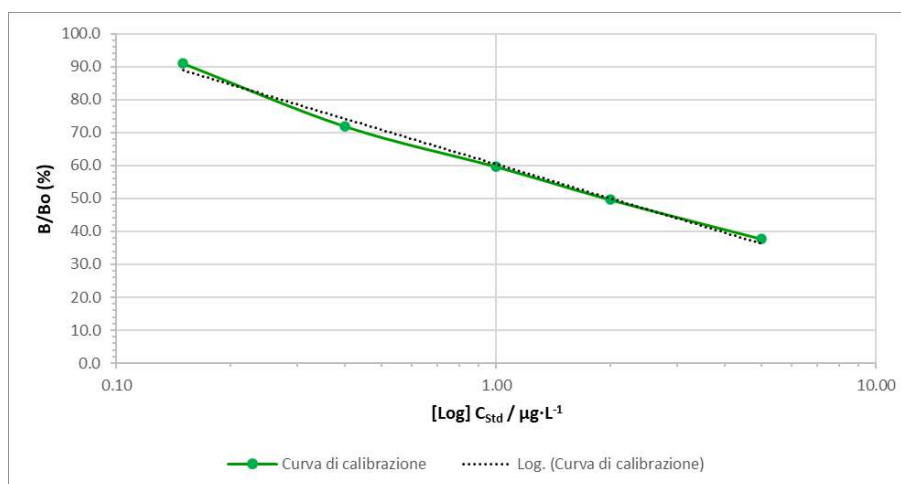


Figura 3.4.1 – Curva di calibrazione, misura LOD

Tutti i requisiti del controllo qualità dell'analisi sono stati raggiunti. Con una media aritmetica pari a 0.39 $\mu\text{g}/\text{L}$ e una σ pari a 0.04 $\mu\text{g}/\text{L}$, l'LOD risulta essere pari a 0.14 $\mu\text{g}/\text{L}$. LOD è accettabile secondo il metodo. Il coefficiente di correlazione della retta individuata dai punti di taratura è pari a 0.993.

La determinazione dell'LOQ è stata eseguita svolgendo undici analisi replicate dello standard a concentrazione 0.15 µg/L, la concentrazione al limite di rivelabilità del software di elaborazione dati. L'LOQ è stato calcolato come di seguito, secondo quanto riportato nella guida EURACHEM “The fitness for purpose of analytical method” II° ed. 2014³⁴,

$$LOQ = x_m + 10 \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (3.4.2)$$

dove x_m è la media aritmetica delle replicate, σ è la deviazione standard delle replicate e $n=10$ è il numero delle replicate considerate. Si riportano di seguito i dati sperimentalmente ottenuti (Tabelle 3.4.3-4, Figura 3.4.2)

Tabella 3.4.3 – Standard di calibrazione, misura LOQ

C_{Std} / µg·L⁻¹	O.D.1	O.D.2	Media	C.V.(%)	B/Bo(%)
0	1.556	1.518	1.537	1.748	
0.15	1.335	1.403	1.369	3.512	100.146
0.40	1.119	1.115	1.117	0.253	81.712
1.00	0.866	0.867	0.867	0.082	63.387
2.00	0.730	0.701	0.716	2.866	52.341
5.00	0.479	0.547	0.513	9.373	37.527

Tabella 3.4.4 – Campioni, misura LOQ. *non considerato ai fini del calcolo dell'LOQ

Campione	Descrizione campione	O.D.1	O.D.2	Media	C.V.(%)	B/Bo (%)	C / µg·L⁻¹
1	Controllo	0.955	0.970	0.963	1.102	70.410	0.704
2	Std 0.15 µg/L	1.345	1.353	1.349	0.419	98.683	0.162
3	Std 0.15 µg/L	1.338	1.341	1.340	0.158	97.988	0.168
4	Std 0.15 µg/L	1.398	1.298	1.348	5.246	98.610	0.163
5	Std 0.15 µg/L	1.385	1.319	1.352	3.452	98.903	0.160
6	Std 0.15 µg/L	1.342	1.333	1.338	0.476	97.842	0.170
7	Std 0.15 µg/L	1.227	1.351	1.289	6.802	94.294	0.205
8	Std 0.15 µg/L	1.347	1.374	1.361	1.403	99.525	0.155
9	Std 0.15 µg/L	1.316	1.318	1.317	0.107	96.342	0.184
10	Std 0.15 µg/L	1.365	1.340	1.353	1.307	98.939	0.160
11	Std 0.15 µg/L	1.234	1.485	1.360	13.055	99.451	0.156
12*	Std 0.15 µg/L	1.342	1.347	1.345	0.263	98.354	0.165
13	LBR	1.564	1.586	1.575	0.988	115.216	< 0,15
14	LCRC	1.119	1.114	1.117	0.317	81.675	0.401

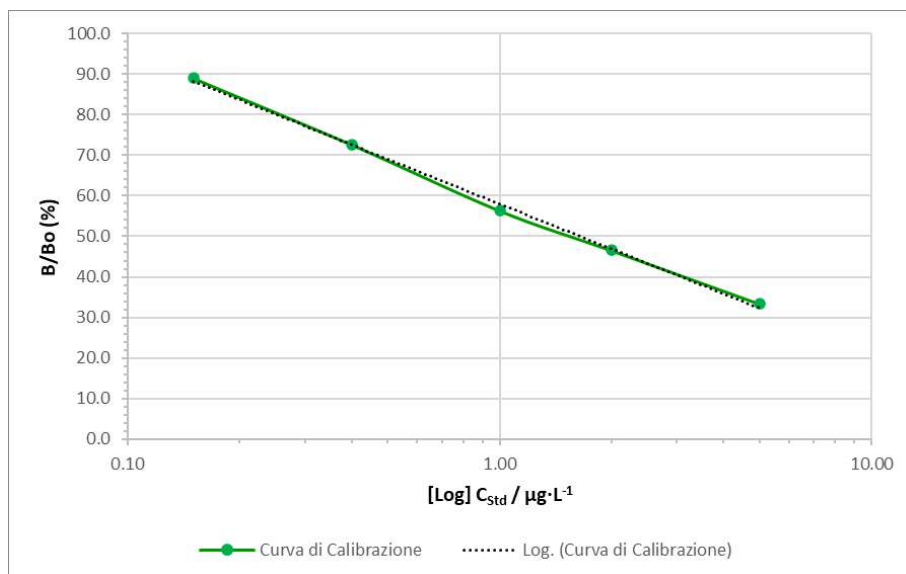


Figura 3.4.2 – Curva di calibrazione, misura LOQ

Tutti i requisiti del controllo qualità dell'analisi sono stati raggiunti. Con x_m pari a $0.17 \mu\text{g/L}$ e σ pari a $0.02 \mu\text{g/L}$, l'LOQ risulta essere $0.22 \mu\text{g/L}$. Il coefficiente di correlazione della retta individuata dai punti di taratura risulta pari a 0.998.

Si riportano ora le prove ripetute su dei bianchi (Tabelle 3.4.5-6, Figura 3.4.3)

Tabella 3.4.5 – Standard di calibrazione, analisi dei bianchi

$C_{\text{Std}} / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	O.D.1	O.D.2	Media	C.V.(%)	B/Bo(%)
0	1.992	1.950	1.971	1.507	
0.15	1.677	1.565	1.621	4.886	82.243
0.40	1.432	1.302	1.367	6.724	69.356
1.00	1.075	1.001	1.038	5.041	52.664
2.00	0.764	0.699	0.732	6.283	37.113
5.00	0.583	0.548	0.566	4.376	28.691

Tabella 3.4.6 – Campioni, analisi dei bianchi

Campione	Descrizione campione	O.D.1	O.D.2	Media	C.V.(%)	B/Bo (%)	$C / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
1	Controllo	1.190	1.003	1.097	12.059	55.632	0.850
2	Bianco 1	1.769	2.214	1.992	15.800	101.040	< 0,15
3	Bianco 2	2.055	2.129	2.092	2.501	106.139	< 0,15
4	Bianco 3	2.013	2.024	2.019	0.385	102.410	< 0,15
5	Bianco 4	2.049	2.109	2.079	2.041	105.479	< 0,15
6	Bianco 5	2.027	2.170	2.099	4.819	106.469	< 0,15
7	Bianco 6	2.113	2.217	2.165	3.397	109.843	< 0,15
8	Bianco 7	2.074	2.219	2.147	4.777	108.904	< 0,15
9	Bianco 8	2.038	2.158	2.098	4.044	106.443	< 0,15
10	Bianco 9	2.163	2.083	2.123	2.665	107.712	< 0,15
11	Bianco 10	2.433	2.245	2.339	5.683	118.671	< 0,15
12	LCRC	1.365	1.329	1.347	1.890	68.341	0.423
13	LBR	2.151	1.886	2.019	9.283	102.410	< 0,15

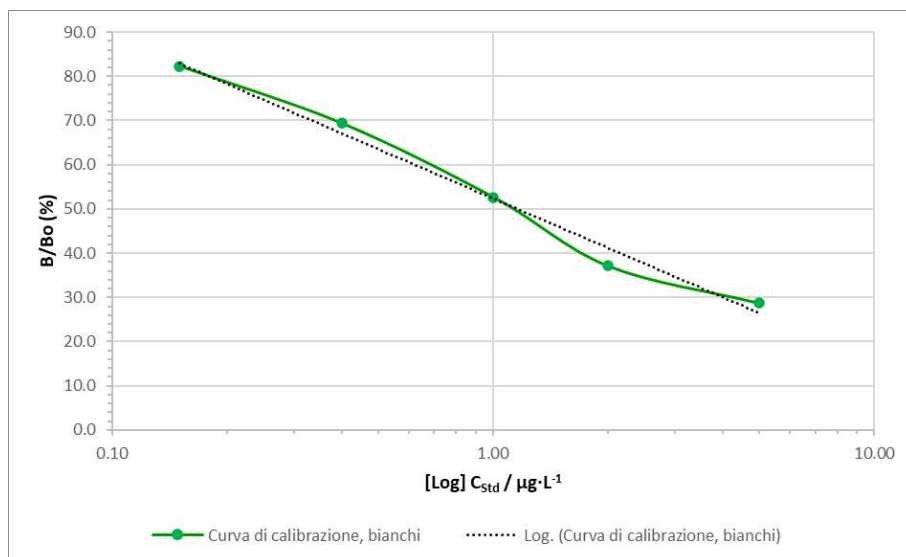


Figura 3.4.3 – Curva di calibrazione, analisi dei bianchi

I requisiti del controllo qualità dell'analisi sono stati raggiunti. Tutti i campioni hanno dato risultati di concentrazione $<0.15 \mu\text{g/L}$ e la retta individuata risulta avere un coefficiente di correlazione di 0,986. Non si rileva quindi la presenza di interferenze dovute alla strumentazione o ai materiali impiegati.

Per vedere se potesse esserci contaminazione reciproca tra pozzetti vicini, è stata svolta una prova alternando un bianco e un'aliquota di standard $1.00 \mu\text{g/L}$ (Tabelle 3.4.7-8, Figura 3.4.4)

Tabella 3.4.7 – Standard di calibrazione, prove di contaminazione

$C_{\text{Std}} / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	O.D.1	O.D.2	Media	C.V.(%)	B/Bo(%)
0	1.824	1.733	1.779	3.618	
0.15	1.544	1.572	1.558	1.271	87.602
0.40	1.357	1.277	1.317	4.295	74.051
1.00	1.108	1.041	1.075	4.409	60.416
2.00	0.931	1.009	0.970	5.686	54.540
5.00	0.680	0.641	0.661	4.175	37.138

Tabella 3.4.8 – Campioni, prove di contaminazione

Campione	Descrizione campione	O.D.1	O.D.2	Media	C.V.(%)	B/Bo (%)	$C / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
1	Controllo	1.112	1.187	1.150	4.614	64.633	0.753
2	Bianco	1.838	1.844	1.841	0.230	103.514	$< 0,15$
3	Std $1.00 \mu\text{g/L}$	1.132	1.147	1.140	0.931	64.071	0.782
4	Bianco	1.758	1.793	1.776	1.394	99.831	$< 0,15$
5	Std $1.00 \mu\text{g/L}$	1.120	1.134	1.127	0.878	63.368	0.820
6	Bianco	1.728	1.817	1.773	3.550	99.663	$< 0,15$
7	Std $1.00 \mu\text{g/L}$	1.142	1.231	1.187	5.304	66.714	0.655
8	Bianco	1.794	1.774	1.784	0.793	100.309	$< 0,15$
9	Std $1.00 \mu\text{g/L}$	1.151	1.152	1.152	0.061	64.746	0.748
10	Bianco	1.741	1.746	1.744	0.203	98.032	$< 0,15$
11	Std $1.00 \mu\text{g/L}$	1.180	1.126	1.153	3.312	64.830	0.743

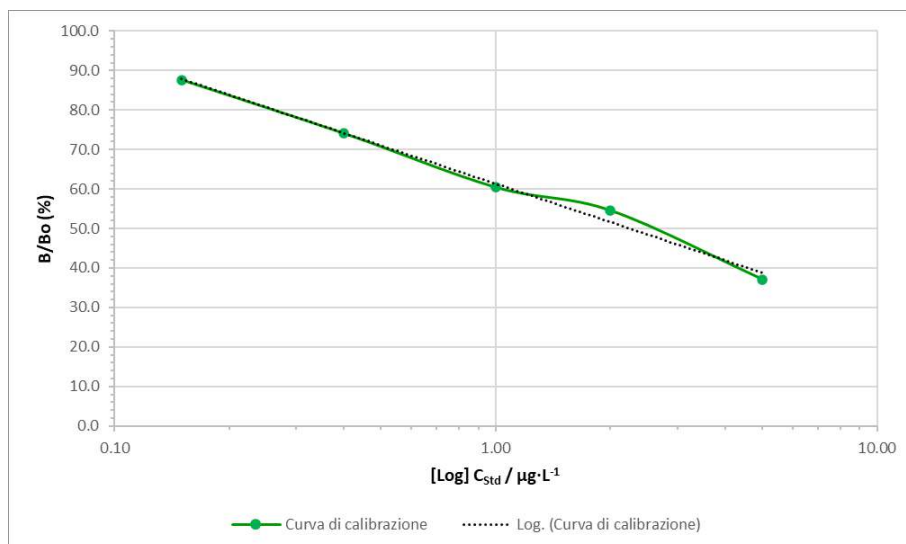


Figura 3.4.4 – Curva di calibrazione, Prove di contaminazione

I requisiti del controllo qualità sono stati raggiunti. Tutti i bianchi hanno concentrazioni $<0.15 \mu\text{g/L}$, gli standard hanno una concentrazione media pari a $0.75 \pm 0.06 \mu\text{g/L}$ e il coefficiente di correlazione della retta individuata risulta 0.992. Non si rileva la presenza di contaminazione reciproca tra pozzetti.

Siccome la lettura dell'assorbanza dei pozzetti può essere fatta entro 15 minuti dal termine delle analisi e visto che durante lo svolgimento del saggio si è notato che non sempre la soluzione di stop portava a un viraggio istantaneo e uniforme della colorazione della soluzione nei pozzetti, si è svolta la lettura di una piastra ELISA a tempi pari a 0, 5, 10 e 15 minuti dal termine dell'analisi, al fine di verificare se questo potesse influenzare l'esito della stessa (Tabelle 3.4.9-10).

Tabella 3.4.9 – Standard di calibrazione, confronto letture a vari tempi. Si riportano in giallo i valori di %C.V. > 10% ma comunque accettabili secondo i termini dell'Ohio EPA Method 701.0, Version 2.4, 2021

	$C_{Std} / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	O.D.1	O.D.2	Media	C.V.(%)	B/Bo(%)
0 min	0	2.042	2.244	2.143	6.665	
	0.15	2.031	2.155	2.093	4.189	97.667
	0.40	1.835	1.881	1.858	1.751	86.701
	1.00	1.549	1.567	1.558	0.817	72.702
	2.00	1.278	1.304	1.291	1.424	60.243
	5.00	1.062	0.896	0.979	11.990	45.684
5 min	0	2.053	2.226	2.140	5.718	
	0.15	2.010	2.102	2.056	3.164	96.097
	0.40	1.805	1.884	1.845	3.029	86.212
	1.00	1.514	1.562	1.538	2.207	71.886
	2.00	1.280	1.287	1.284	0.386	59.991
	5.00	1.049	0.887	0.968	11.834	45.244
10 min	0	2.049	2.210	2.130	5.346	
	0.15	1.994	2.060	2.027	2.302	95.187
	0.40	1.790	1.869	1.830	3.053	85.912
	1.00	1.494	1.554	1.524	2.784	71.566
	2.00	1.265	1.255	1.260	0.561	59.169
	5.00	1.036	0.881	0.959	11.435	45.011
15 min	0	2.039	2.182	2.111	4.791	
	0.15	1.968	2.030	1.999	2.193	94.717
	0.40	1.772	1.838	1.805	2.586	85.525
	1.00	1.477	1.537	1.507	2.815	71.405
	2.00	1.250	1.236	1.243	0.796	58.896
	5.00	1.023	0.870	0.947	11.430	44.847

Tabella 3.4.10 – Campioni, confronto letture a vari tempi. Si riportano in rosso i valori non accettabili secondo il metodo Ohio EPA Method 701.0, Version 2.4, 2021

Campione	0 min		5 min		10 min		15 min	
	C / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	C.V. (%)	C / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	C.V. (%)	C / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	C.V. (%)	C / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	C.V. (%)
Controllo	0.868	1.102	0.791	1.181	0.806	0.354	0.819	0.180
Std 0.15 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.191	2.190	0.163	2.742	0.164	2.393	0.162	2.103
Std 0.15 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.354	2.510	0.330	2.624	0.335	3.488	0.328	3.335
Std 0.15 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.258	3.565	0.257	2.443	0.247	1.358	0.248	0.931
Std 0.15 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.287	0.474	0.275	0.477	0.276	1.040	0.292	1.060
Std 0.15 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.338	0.671	0.339	1.204	0.341	0.874	0.335	0.922
Std 0.15 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.296	1.795	0.271	2.383	0.266	2.478	0.281	1.924
Std 0.15 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.336	2.754	0.330	1.800	0.335	1.857	0.340	1.848
Std 0.15 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.308	5.339	0.307	4.723	0.315	5.461	0.322	6.199
Std 0.15 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.297	0.330	0.284	0.369	0.302	0.825	0.310	1.258
Std 0.15 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.374	3.019	0.349	2.038	0.358	0.840	0.376	0.623
Std 0.15 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.255	1.187	0.232	0.000	0.231	0.219	0.235	0.185
Std 2.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	2.597	1.647	2.686	0.598	2.657	0.182	2.670	0.185
Std 2.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	2.511	3.438	2.586	4.024	2.586	3.549	2.633	3.064
Std 2.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	2.511	6.002	2.594	4.619	2.586	4.391	2.577	4.142
Std 2.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	2.746	4.065	2.805	2.666	2.785	2.703	2.775	2.985
Std 2.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	2.428	0.808	2.487	1.814	2.489	1.786	2.506	1.330
Std 2.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	2.655	1.717	2.586	1.538	2.493	0.774	2.445	0.360
Std 2.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	3.144	6.965	3.092	5.053	3.033	5.037	3.012	5.158
Std 2.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	3.443	6.905	3.267	6.027	3.194	6.393	3.126	6.501
Std 2.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	3.026	3.443	2.986	3.148	2.893	4.410	2.853	4.890
Std 2.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	3.098	7.554	3.008	5.568	2.969	5.632	2.948	5.378
Std 2.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	3.148	0.933	3.123	2.753	3.065	3.095	2.998	3.434
Std 5.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	>5	5.273	>5	5.093	>5	5.238	>5	5.606
Std 5.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	>5	1.811	>5	0.907	>5	0.167	>5	0.503
Std 5.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	>5	6.955	>5	6.704	>5	6.727	>5	7.003
Std 5.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	>5	17.849	>5	15.593	>5	13.365	>5	12.840
Std 5.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	>5	8.461	>5	5.202	>5	4.882	>5	4.432
Std 5.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	>5	5.027	>5	3.503	>5	0.168	>5	1.094
Std 5.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	>5	4.050	>5	5.244	>5	6.584	>5	7.434
Std 5.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	>5	4.387	>5	5.103	>5	5.130	>5	5.596
Std 5.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	>5	9.944	>5	11.002	>5	12.728	>5	13.498
Std 5.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	>5	0.350	>5	0.174	>5	1.030	>5	2.045
Std 5.00 $\mu\text{g}/\text{L}$	>5	3.089	>5	1.616	>5	0.509	>5	1.782
LBR	0.163	4.470	< 0,15	4.500	< 0,15	4.011	< 0,15	3.305
LCRC	0.676	3.104	0.504	2.801	0.520	1.055	0.522	0.535

Il dato dello standard 5.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ risulta avere un %C.V.>10% ma <15%. Per le letture a 5, 10 e 15 minuti, essendo l'unica %C.V. tra standard e controlli compresa in tale intervallo, l'analisi risulta accettabile. Nella lettura a 0 min anche le concentrazioni di LBR e LCRC non sono accettabili e l'analisi dovrebbe risultare invalida. I valori di LBR e LCRC necessari per validare la qualità dell'analisi risultano stabili e accettabili dalla lettura a cinque minuti in poi. Le concentrazioni degli

standard rilevate, nonostante si discostino dalla loro concentrazione nominale, sono concordi nelle quattro letture, con deviazioni standard comprese tra 0.003 e 0.14 µg/L. Il valore del controllo più vicino a 0.75 µg/L è quello della lettura a cinque minuti.

La riproducibilità e la stima dell'errore sistematico (BIAS) dell'analisi sono state ricavate sfruttando Proficiency Test (PT) del circuito internazionale ABRAXIS e del circuito IELAB. La riproducibilità viene valutata osservando il cosiddetto z-score, che per i suddetti circuiti interlaboratorio viene calcolato nel modo seguente.

$$z = \frac{x-X}{\sigma} \quad (3.4.3)$$

x: valore rilevato dal laboratorio per l'analita (µg/L)

X: valore assegnato, considerato come miglior stima del valore vero della concentrazione di analita nel campione (µg/L)

σ: deviazione standard del PT (µg/L)

L'analisi risulta: riproducibile se $|z| \leq 2$, non soddisfacente se $|z| \geq 3$, dubbia se $2 < |z| < 3$.

Il BIAS viene calcolato come %BIAS

$$\%BIAS = \frac{x-Y}{Y} \cdot 100 \quad (3.4.4)$$

dove Y corrisponde alla concentrazione media del circuito in µg/L.

Di seguito si riportano i valori ottenuti per i PT svolti negli ultimi quattro anni dal laboratorio di Acque Bresciane (Tabella 3.4.11).

Tabella 3.4.11 – Risultati dei PT e %BIAS ottenuti.

MATRICE	CIRCUITO	ID CAMPIONE	x/µg·L ⁻¹	Y/µg·L ⁻¹	tipo di media riportata	σ/µg·L ⁻¹	tipo di scarto tipo riportato	n°lab partecipanti	z	BIAS %
acqua potabile	ABRAXIS	18MC-TK-1	1.12	0.99	robusta	0.22	assegnato	34	0.62	13.1
acqua potabile	ABRAXIS	18MC-TK-2	<0.15	ND	ND	ND	ND	34	ND	ND
acqua potabile	ABRAXIS	18MC-TK-3	1.53	1.48	robusta	0.32	assegnato	34	0.16	3.4
acqua potabile	ABRAXIS	18MC-TK-4	0.39	0.42	robusta	0.09	assegnato	33	-0.37	-7.1
acqua potabile	IELAB	Raw water - aprile 2019	0.562	0.54	assegnato	0.081	assegnato	6	-0.46	4.1
acqua naturale	ABRAXIS	21MC-TK-5	0.66	0.67	robusta	0.15	assegnato	64	-0.09	-1.5
acqua naturale	ABRAXIS	21MC-TK-6	9.34	7.77	robusta	1.70	assegnato	62	0.96	20.2
acqua naturale	ABRAXIS	21MC-TK-7	<0.15	ND	ND	ND	ND	49	ND	ND
acqua naturale	ABRAXIS	21MC-TK-8	7.58	6.62	robusta	1.46	assegnato	62	0.66	14.5

I dati mostrano che il laboratorio ha superato tutti i PT con z-score conformi e questo è indice di riproducibilità. I %BIAS si trovano in un intervallo compreso tra -7.1 e 20.2% con un massimo di 13.1% per livelli di concentrazione rientranti nel campo di misura dell'analisi.

Si riportano di seguito i dati delle prove effettuate sugli standard e sui campioni inquinati, ottenuti inquinando aliquote di campioni la cui concentrazione di MC-LR fosse <0.15 µg/L con aliquote di standard di microcistine (Tabelle 3.4.12-21, Figure 3.4.5-9). Per lo standard 0.15 µg/L si vedano le tabelle 3.4.3-4 e la figura 3.4.2.

Tabella 3.4.12 – Campioni, prove su standard 0.40, 1.00 µg/L e campione inquinato a 0.30 µg/L.

Campione	Descrizione campione	O.D.1	O.D.2	Media	C.V.(%)	B/Bo (%)	C / µg·L ⁻¹
1	Controllo	1.253	1.199	1.226	3.114	60.813	0.915
2	Std 0.40 µg/L	1.429	1.511	1.470	3.944	72.917	0.380
3	Std 0.40 µg/L	1.569	1.542	1.556	1.227	77.158	0.305
4	Std 0.40 µg/L	1.436	1.450	1.443	0.686	71.577	0.410
5	Std 0.40 µg/L	1.442	1.419	1.431	1.137	70.957	0.429
6	Std 0.40 µg/L	1.377	1.393	1.385	0.817	68.700	0.508
7	Std 0.40 µg/L	1.516	1.405	1.461	5.374	72.445	0.389
8	Std 0.40 µg/L	1.396	1.373	1.385	1.175	68.676	0.509
9	Std 0.40 µg/L	1.397	1.423	1.410	1.304	69.940	0.463
10	Std 0.40 µg/L	1.399	1.377	1.388	1.121	68.849	0.502
11	Std 0.40 µg/L	1.552	1.486	1.519	3.072	75.347	0.335
12	Std 0.40 µg/L	1.598	1.401	1.500	9.290	74.380	0.352
13	Std 1.00 µg/L	1.259	1.129	1.194	7.699	59.226	1.028
14	Std 1.00 µg/L	1.293	1.201	1.247	5.217	61.855	0.847
15	Std 1.00 µg/L	1.245	1.334	1.290	4.880	63.963	0.723
16	Std 1.00 µg/L	1.282	1.061	1.172	13.339	58.110	1.110
17	Std 1.00 µg/L	1.186	1.181	1.184	0.299	58.705	1.065
18	Std 1.00 µg/L	1.298	1.050	1.174	14.937	58.234	1.101
19	Std 1.00 µg/L	1.191	1.261	1.226	4.037	60.813	0.915
20	Std 1.00 µg/L	1.088	1.162	1.125	4.651	55.804	1.302
21	Std 1.00 µg/L	1.245	1.334	1.290	4.880	63.963	0.723
22	Std 1.00 µg/L	1.208	1.215	1.212	0.409	60.094	0.965
23	Std 1.00 µg/L	1.192	1.227	1.210	2.046	59.995	0.973
24	Campione 0.30 µg/L	1.483	1.532	1.508	2.298	74.777	0.345
25	Campione 0.30 µg/L	1.484	1.391	1.438	4.575	71.305	0.418
26	Campione 0.30 µg/L	1.654	1.461	1.558	8.762	77.257	0.304
27	Campione 0.30 µg/L	1.545	1.433	1.489	5.319	73.859	0.362
28	Campione 0.30 µg/L	1.618	1.610	1.614	0.350	80.060	0.263
29	Campione 0.30 µg/L	1.509	1.530	1.520	0.977	75.372	0.335
30	Campione 0.30 µg/L	1.561	1.491	1.526	3.244	75.694	0.329
31	Campione 0.30 µg/L	1.589	1.488	1.539	4.642	76.314	0.319
32	Campione 0.30 µg/L	1.547	1.507	1.527	1.852	75.744	0.328
33	Campione 0.30 µg/L	1.481	1.412	1.447	3.373	71.751	0.404
34	Campione 0.30 µg/L	1.583	1.280	1.432	14.967	71.007	0.428
35	LBR	1.857	1.833	1.845	0.920	91.518	< 0,15
36	LCRC	1.331	1.411	1.371	4.126	68.006	0.535

Tabella 3.4.13 – Standard di calibrazione, prove su standard 0.40, 1.00 µg/L e campione inquinato a 0.30 µg/L.

C_{Std} / µg·L⁻¹	O.D.1	O.D.2	Media	C.V.(%)	B/Bo(%)
0	1.992	2.040	2.016	1.684	
0.15	1.879	1.790	1.835	3.430	90.997
0.40	1.399	1.500	1.450	4.927	71.900
1.00	1.261	1.143	1.202	6.942	59.623
2.00	1.032	0.967	1.000	4.598	49.578
5.00	0.752	0.765	0.759	1.212	37.624

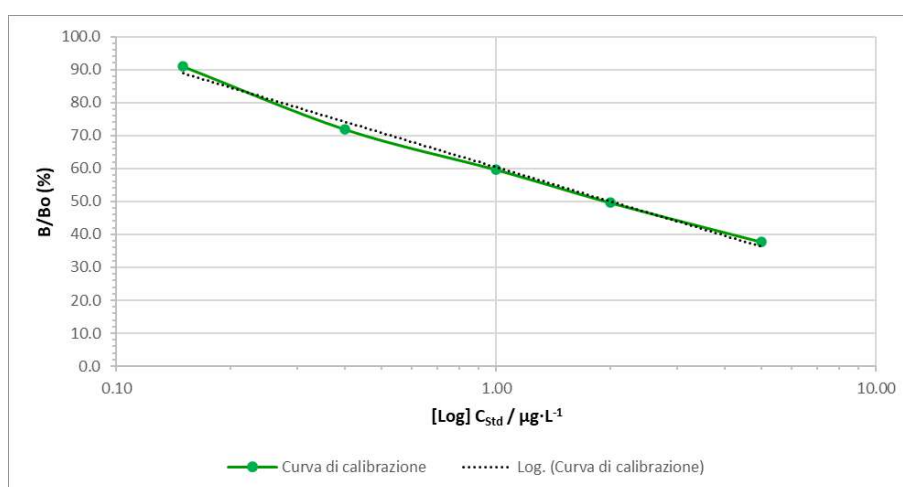


Figura 3.4.5 – Curva di calibrazione, prove su standard 0.40, 1.00 µg/L e campione inquinato a 0.30 µg/L.

Tabella 3.4.14 – Standard di calibrazione, prove su standard 2.00 µg/L.

C_{Std} / µg·L⁻¹	O.D.1	O.D.2	Media	C.V.(%)	B/Bo(%)
0	2.053	2.226	2.140	5.718	
0.15	2.010	2.102	2.056	3.164	96.097
0.40	1.805	1.884	1.845	3.029	86.212
1.00	1.514	1.562	1.538	2.207	71.886
2.00	1.280	1.287	1.284	0.386	59.991
5.00	1.049	0.887	0.968	11.834	45.244

Tabella 3.4.15 – Campioni, prove su standard 2.00 µg/L.

Campione	Descrizione campione	O.D.1	O.D.2	Media	C.V.(%)	B/Bo (%)	C / µg·L ⁻¹
1	Controllo	1.630	1.603	1.617	1.181	75.555	0.791
2	Std 2.00 µg/L	1.177	1.187	1.182	0.598	55.247	2.686
3	Std 2.00 µg/L	1.161	1.229	1.195	4.024	55.854	2.586
4	Std 2.00 µg/L	1.233	1.155	1.194	4.619	55.807	2.594
5	Std 2.00 µg/L	1.189	1.145	1.167	2.666	54.545	2.805
6	Std 2.00 µg/L	1.224	1.193	1.209	1.814	56.485	2.487
7	Std 2.00 µg/L	1.208	1.182	1.195	1.538	55.854	2.586
8	Std 2.00 µg/L	1.174	1.093	1.134	5.053	52.980	3.092
9	Std 2.00 µg/L	1.162	1.067	1.115	6.027	52.092	3.267
10	Std 2.00 µg/L	1.171	1.120	1.146	3.148	53.541	2.986
11	Std 2.00 µg/L	1.188	1.098	1.143	5.568	53.424	3.008
12	Std 2.00 µg/L	1.152	1.108	1.130	2.753	52.816	3.123
13	LBR	1.993	2.124	2.059	4.500	96.214	< 0,15
14	LCRC	1.802	1.732	1.767	2.801	82.589	0.504

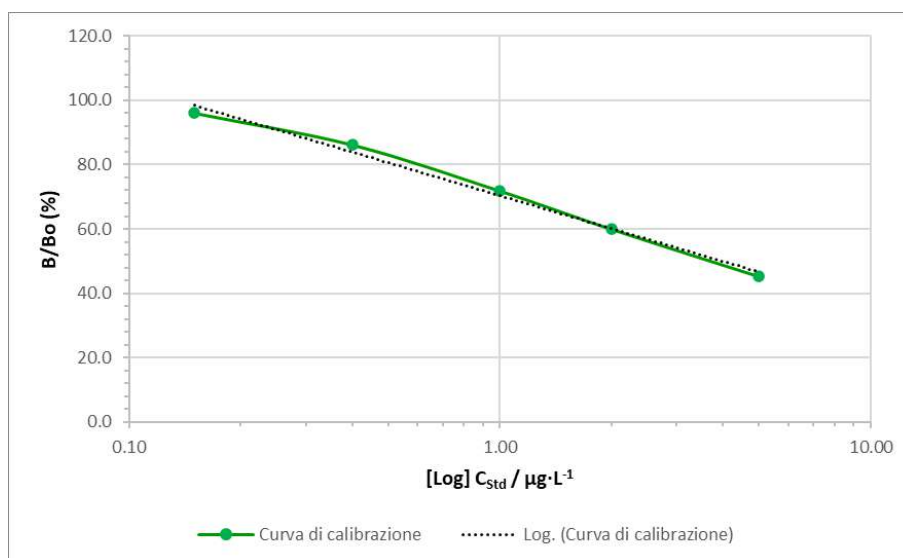


Figura 3.4.6 – Curva di calibrazione, prove su standard 2.00 µg/L.

Tabella 3.4.16 – Standard di calibrazione, prove su standard 5.00 µg/L.

C _{Std} / µg·L ⁻¹	LOG	O.D.1	O.D.2	Media	C.V.(%)	B/Bo(%)
0		1.992	2.040	2.016	1.684	
0.15	-0.82	1.879	1.790	1.835	3.430	90.997
0.40	-0.40	1.399	1.500	1.450	4.927	71.900
1.00	0.00	1.261	1.143	1.202	6.942	59.623
2.00	0.30	1.032	0.967	1.000	4.598	49.578
5.00	0.70	0.752	0.765	0.759	1.212	37.624

Tabella 3.4.17 – Campioni, prove su standard 5.00 µg/L. *concentrazione non apprezzabile e per questo non considerata nei calcoli successivi

Campione	Descrizione campione	O.D.1	O.D.2	Media	C.V.(%)	B/Bo (%)	C / µg·L ⁻¹
1	Controllo	1.205	1.247	1.226	2.422	74.574	0.641
2	Std 5.00 µg/L	0.696	0.698	0.697	0.203	42.397	3.815
3	Std 5.00 µg/L	0.594	0.717	0.656	13.268	39.872	4.397
4	Std 5.00 µg/L	0.664	0.670	0.656	13.268	39.872	4.227
5	Std 5.00 µg/L	0.664	0.680	0.667	0.636	40.572	4.156
6	Std 5.00 µg/L	0.612	0.636	0.672	1.684	40.876	4.898
7	Std 5.00 µg/L	0.628	0.752	0.624	2.720	37.956	3.907
8	Std 5.00 µg/L	0.719	0.678	0.690	12.707	41.971	3.795
9	Std 5.00 µg/L	0.718	0.693	0.699	4.151	42.488	3.705
10	Std 5.00 µg/L	0.615	0.722	0.706	2.506	42.914	4.206
11*	Std 5.00 µg/L	0.656	0.559	0.669	11.318	40.663	>5
12	Std 5.00 µg/L	0.698	0.737	0.608	11.290	36.953	3.556
13	LBR	1.785	1.754	0.718	3.844	43.644	< 0,15
14	LCRC	1.323	1.321	1.770	1.239	107.634	0.409

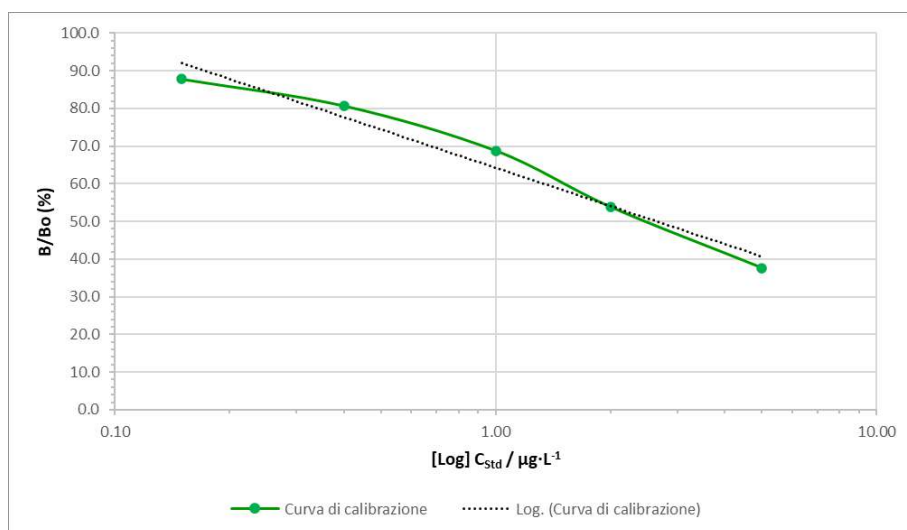


Figura 3.4.7 – Curva di calibrazione, prove su standard 5.00 µg/L.

Tabella 3.4.18 – Standard di calibrazione, prove su campioni inquinati a 0.15 e 1.00 µg/L.

C _{Std} / µg·L ⁻¹	O.D.1	O.D.2	Media	C.V.(%)	B/Bo(%)
0	2.137	2.188	2.163	1.668	
0.15	1.879	2.015	1.947	4.939	90.035
0.40	1.777	1.605	1.691	7.192	78.197
1.00	1.333	1.285	1.309	2.593	60.532
2.00	0.876	0.883	0.880	0.563	40.671
5.00	0.705	0.689	0.697	1.623	32.231

Tabella 3.4.19 – Campioni, prove su campioni inquinati a 0.15 e 1.00 µg/L.

Campione	Descrizione campione	O.D.1	O.D.2	Media	C.V.(%)	B/Bo (%)	C / µg·L ⁻¹
1	Controllo	1.489	1.332	1.411	7.871	65.225	0.784
2	Campione 1.00 µg/L	1.309	1.305	1.307	0.216	60.439	1.003
3	Campione 1.00 µg/L	1.301	1.314	1.308	0.703	60.462	1.002
4	Campione 1.00 µg/L	1.266	1.358	1.312	4.958	60.671	0.993
5	Campione 1.00 µg/L	1.305	1.312	1.309	0.378	60.509	1.001
6	Campione 1.00 µg/L	1.313	1.307	1.310	0.324	60.578	0.998
7	Campione 1.00 µg/L	1.265	1.268	1.267	0.167	58.566	1.071
8	Campione 1.00 µg/L	1.278	1.277	1.278	0.055	59.075	1.052
9	Campione 1.00 µg/L	1.302	1.305	1.304	0.163	60.277	1.009
10	Campione 1.00 µg/L	1.306	1.297	1.302	0.489	60.185	1.012
11	Campione 1.00 µg/L	1.304	1.309	1.307	0.271	60.416	1.004
12	Campione 1.00 µg/L	1.306	1.315	1.311	0.486	60.601	0.996
13	Campione 0.15 µg/L	1.897	1.997	1.947	3.632	90.035	0.150
14	Campione 0.15 µg/L	1.988	1.901	1.945	3.164	89.919	0.151
15	Campione 0.15 µg/L	1.927	1.924	1.926	0.110	89.040	0.163
16	Campione 0.15 µg/L	1.921	1.926	1.924	0.184	88.948	0.164
17	Campione 0.15 µg/L	1.925	1.936	1.931	0.403	89.272	0.160
18	Campione 0.15 µg/L	1.931	1.942	1.937	0.402	89.549	0.156
19	Campione 0.15 µg/L	1.941	1.946	1.944	0.182	89.873	0.152
20	Campione 0.15 µg/L	1.929	1.934	1.932	0.183	89.318	0.159
21	Campione 0.15 µg/L	1.929	1.930	1.930	0.037	89.225	0.160
22	Campione 0.15 µg/L	1.945	1.947	1.946	0.073	89.988	0.151
23	Campione 0.15 µg/L	1.899	1.901	1.900	0.074	87.861	0.180
24	LBR	2.250	2.320	2.285	2.166	105.665	< 0,15
25	LCRC	1.605	1.707	1.656	4.355	76.578	0.435

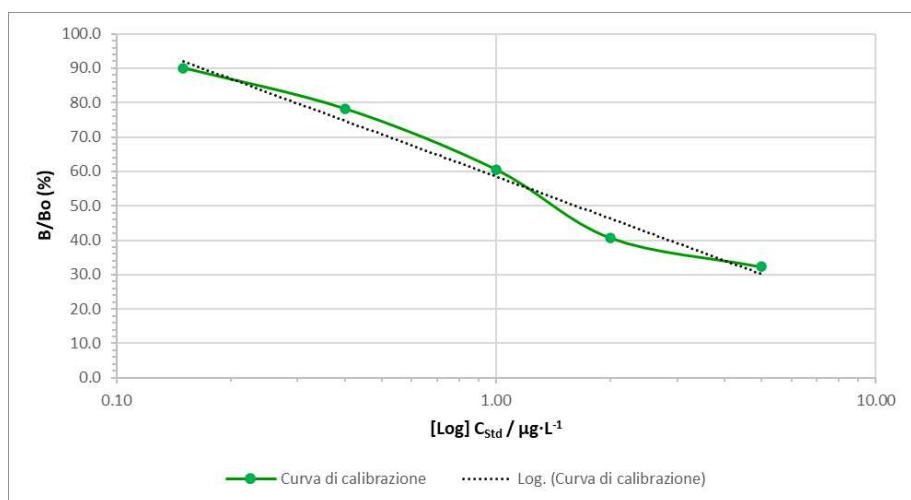


Figura 3.4.8 – Curva di calibrazione, prove campioni inquinati a 0.15 e 1.00 µg/L.

Tabella 3.4.20 – Standard di calibrazione, prove su campioni inquinati a 0.50 e 5.00 µg/L.

C_{Std} / µg·L⁻¹	O.D.1	O.D.2	Media	C.V.(%)	B/Bo(%)
0	1.828	1.803	1.816	0.974	
0.15	1.616	1.554	1.585	2.766	87.304
0.40	1.601	1.550	1.576	2.289	86.781
1.00	1.258	1.123	1.191	8.018	65.574
2.00	1.046	0.992	1.019	3.747	56.128
5.00	0.754	0.764	0.759	0.932	41.807

Tabella 3.4.21 – Campioni, prove su campioni inquinati a 0.50 e 5.00 µg/L. *concentrazione non apprezzabile e per questo non considerata nei calcoli successivi

Campione	Descrizione campione	O.D.1	O.D.2	Media	C.V.(%)	B/Bo (%)	C / µg·L⁻¹
1	Controllo	1.216	1.223	1.220	0.406	67.172	0.933
2	Campione 5.00 µg/L	0.726	0.832	0.779	9.622	42.908	4.660
3	Campione 5.00 µg/L	0.804	0.777	0.791	2.415	43.542	4.475
4	Campione 5.00 µg/L	0.780	0.821	0.801	3.622	44.093	4.320
5	Campione 5.00 µg/L	0.745	0.818	0.782	6.605	43.046	4.619
6	Campione 5.00 µg/L	0.805	0.764	0.785	3.696	43.211	4.570
7	Campione 5.00 µg/L	0.792	0.779	0.786	1.170	43.266	4.554
8	Campione 5.00 µg/L	0.722	0.872	0.797	13.308	43.900	4.373
9	Campione 5.00 µg/L	0.770	0.821	0.796	4.533	43.817	4.396
10*	Campione 5.00 µg/L	0.581	0.683	0.632	11.412	34.811	>5
11	Campione 5.00 µg/L	0.781	0.807	0.794	2.315	43.735	4.420
12	Campione 5.00 µg/L	0.797	0.781	0.789	1.434	43.459	4.498
13*	Campione 0.50 µg/L	1.555	1.645	1.600	3.977	88.130	< 0,15
14	Campione 0.50 µg/L	1.304	1.545	1.425	11.963	78.463	0.573
15	Campione 0.50 µg/L	1.373	1.438	1.406	3.270	77.417	0.599
16	Campione 0.50 µg/L	1.408	1.398	1.403	0.504	77.279	0.603
17	Campione 0.50 µg/L	1.432	1.395	1.414	1.851	77.857	0.588
18	Campione 0.50 µg/L	1.488	1.415	1.452	3.556	79.950	0.537
19	Campione 0.50 µg/L	1.429	1.430	1.430	0.049	78.739	0.566
20	Campione 0.50 µg/L	1.490	1.534	1.512	2.058	83.283	0.465
21	Campione 0.50 µg/L	1.555	1.555	1.555	0.000	85.651	0.420
22	Campione 0.50 µg/L	1.440	1.464	1.452	1.169	79.978	0.537
23	Campione 0.50 µg/L	1.391	1.413	1.402	1.110	77.224	0.604
24	LBR	1.775	1.826	1.801	2.003	99.174	< 0,15
25	LCRC	1.605	1.409	1.507	9.197	83.007	0.471

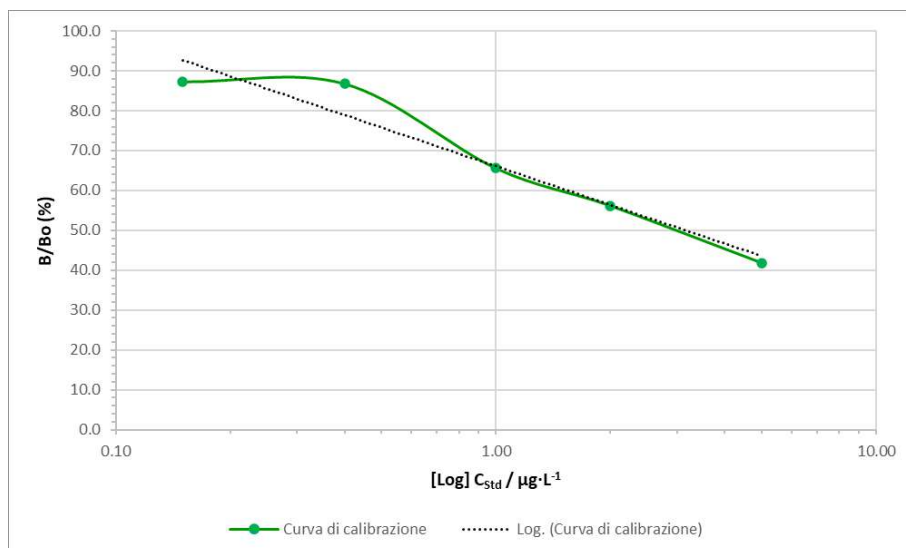


Figura 3.4.9 – Curva di calibrazione, prove campioni inquinati a 0.50 e 5.00 µg/L.

Nella tabella 3.4.22 si riportano i valori medi di concentrazione (x_m), le relative deviazioni standard o scarti tipo di ripetibilità (σ_r) e il coefficiente di correlazione della retta (R^2) di ciascuna prova.

Tabella 3.4.22 – Risultati delle analisi: media aritmetica, deviazione standard di ripetibilità e coefficiente di calibrazione della retta.

	$C / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$x_m / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$\sigma_r / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	R^2
Standard	0.15	0.17	0.01	0.998
	0.40	0.42	0.07	0.993
	1.00	1.0	0.2	0.993
	2.00	2.6	0.8	0.991
	5.00	4.1	0.4	0.965
Campione inquinato	0.15	0.159	0.009	0.976
	0.30	0.35	0.05	0.993
	0.50	0.55	0.06	0.940
	1.00	1.01	0.03	0.976
	5.00	4.5	0.1	0.940

I requisiti del controllo qualità sono stati raggiunti. Su queste prove sono stati effettuati calcoli di ripetibilità, esattezza e incertezza di misura. L'incertezza di misura è stata calcolata seguendo il metodo metrologico.

Per valutare la ripetibilità, o meglio l'incertezza di ripetibilità (U_r), oltre a media aritmetica e deviazione standard, su ogni set di dati sono stati calcolati i seguenti parametri (Tabella 3.4.23):

- varianza (σ_r^2)
- coefficiente di variazione percentuale di ripetibilità (CV_r %):

$$CV_r \% = \frac{x_m}{\sigma_r} \cdot 100 \quad (3.4.5)$$

- limite di ripetibilità (L_r), incertezza di ripetibilità (U_r) e incertezza relativa di ripetibilità ($U_{r\text{rel}}$):

$$L_r / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} = 2\sqrt{2} \cdot \sigma_r \quad (3.4.6)$$

$$U_r / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} = \frac{\sigma_r}{\sqrt{n}} \quad \text{con } n \text{ pari al numero di dati considerati} \quad (3.4.7)$$

$$U_{r\text{rel}} = \frac{U_r}{x_m} \quad (3.4.8)$$

Tabella 3.4.23 – Incertezza di ripetibilità

	$C / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	n	$x_m / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\sigma_r / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\sigma_r^2 / \mu\text{g}^2 \cdot \text{L}^{-2}$	$CV_r \%$	$L_r / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$U_r / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$U_{r\text{rel}}$
Standard	0.15	11	0.17	0.01	$2 \cdot 10^{-4}$	8.7	0.04	$4 \cdot 10^{-3}$	0.026
	0.40	11	0.42	0.07	$5 \cdot 10^{-3}$	17.3	0.2	0.02	0.052
	1.00	11	1.0	0.2	0.03	17.7	0.5	0.05	0.053
	2.00	11	2.8	0.3	0.07	9.4	0.8	0.08	0.028
	5.00	10	4.1	0.4	0.2	9.7	1.1	0.1	0.031
Campione inquinato	0.15	11	0.159	$9 \cdot 10^{-3}$	$7 \cdot 10^{-5}$	5.4	0.02	$3 \cdot 10^{-3}$	0.016
	0.30	11	0.35	0.05	$3 \cdot 10^{-3}$	14.5	0.1	0.02	0.044
	0.50	10	0.55	0.06	$4 \cdot 10^{-3}$	11.3	0.2	0.02	0.036
	1.00	11	1.01	0.03	$6 \cdot 10^{-4}$	2.5	0.07	$8 \cdot 10^{-3}$	$7.5 \cdot 10^{-3}$
	5.00	10	4.5	0.1	0.01	2.5	0.3	0.04	$7.9 \cdot 10^{-3}$

Si è calcolata l'incertezza dovuta alla vetreria e alle pipette automatiche, chiamata incertezza di diluizione (U_d), nonché l'incertezza relativa agli standard (u_{std}) (Tabelle 3.4.24-25).

- Incertezza della vetreria o delle pipette (u_{vet}):

$$u_{\text{vet}} = \frac{\sigma_{\text{vet}}}{\sqrt{3} \cdot V} \quad (3.4.9)$$

con σ_{vet} la tolleranza di vetreria o delle pipette in mL e V il volume considerato in mL

- Incertezza composta relativa alle diluizioni (U_d):

$$U_d = \sqrt{(\sum_i f_i^1 \cdot u_{\text{vet}}^2)^2 + (\sum_i f_i^2 \cdot u_{\text{vet}}^2)^2 + (\sum_i f_i^3 \cdot u_{\text{vet}}^2)^2} \quad (3.4.10)$$

con f_i^n il fattore di diluizione n-esima che indica quante volte si è effettuata una diluizione di un materiale certificato (CMR) per l'i-esimo termine.

- Incertezza relativa alla soluzione standard (u_{std}):

$$u_{\text{std}} = \frac{\sigma_{\text{std}}}{2 \cdot C_{\text{std}}} \quad (3.4.11)$$

con σ_{std} e C_{std} la deviazione standard e la concentrazione del materiale certificato in $\mu\text{g}/\text{L}$.

Tabella 3.4.24 – Incertezza della vetreria e delle pipette

i	Descrizione	V/mL	σ_{vet}/mL	u_{vet}	f_i^1	f_i^2	f_i^3
1	Pipetta graduata sterile da 1 mL	1.00	0.01	$5.77 \cdot 10^{-3}$	1	0	0
2	Micropipetta Eppendorf monocanale 10-100 μL	0.0100	$3 \cdot 10^{-4}$	0.0173	1	0	0
3	Micropipetta Eppendorf monocanale 10-100 μL	0.0500	$5 \cdot 10^{-4}$	$5.77 \cdot 10^{-3}$	2	0	0
4	Micropipetta Eppendorf monocanale 10-100 μL	0.1000	$8 \cdot 10^{-4}$	$4.62 \cdot 10^{-3}$	2	0	0
5	Micropipetta Eppendorf multicanale 30-300 μL	0.0300	$9 \cdot 10^{-4}$	0.0173	4	0	0
6	Micropipetta Eppendorf multicanale 30-300 μL	0.1500	$1.5 \cdot 10^{-3}$	$8.16 \cdot 10^{-3}$	4	0	0
7	Pipetta graduata sterile da 1 mL	0.35	0.01	0.0233	0	1	0
8	Pipetta graduata sterile da 10 mL	2.2	0.1	0.0371	0	1	0
9	Pipetta graduata sterile da 1 mL	0.30	0.01	0.0272	0	1	0
10	Pipetta graduata sterile da 10 mL	4.7	0.1	0.0174	0	1	0
11	Pipetta graduata sterile da 1 mL	0.90	0.01	$9.07 \cdot 10^{-3}$	0	1	0
12	Micropipetta Eppendorf monocanale 10-100 μL	0.0100	$3 \cdot 10^{-4}$	0.0173	0	1	0
13	Pipetta graduata sterile da 1 mL	1.00	0.01	$5.77 \cdot 10^{-3}$	0	1	0
14	Pipetta graduata sterile da 10 mL	4.0	0.1	0.0204	0	1	0
15	Pipetta graduata sterile da 1 mL	0.50	0.01	0.0163	0	0	1
16	Pipetta graduata sterile da 10 mL	4.5	0.1	0.0181	0	0	1
17	matraccio classe A 25 mL	25.00	0.04	$1.31 \cdot 10^{-3}$	0	1	0
18	Micropipetta Kartel 100-1000 μL	0.100	$8 \cdot 10^{-3}$	0.0653	0	1	0

Tabella 3.4.25 – Incertezza relativa alla soluzione standard e incertezza composta relativa alle diluizioni

	$C / \mu g \cdot L^{-1}$	$C_{std} / \mu g \cdot L^{-1}$	$\sigma_{std} / \mu g \cdot L^{-1}$	u_{std}	U_d
Standard	0.15	0.15	0.015	0.05	0.0437
	0.40	0.40	0.06	0.075	0.0437
	1.00	1.00	0.16	0.08	0.0437
	2.00	2.00	0.9	0.225	0.0437
	5.00	5.00	0.035	$3.5 \cdot 10^{-3}$	0.0437
Campione inquinato	0.15	5.00	0.035	$3.5 \cdot 10^{-3}$	0.0619
	0.30	5.00	0.035	$3.5 \cdot 10^{-3}$	0.0543
	0.50	5.00	0.035	$3.5 \cdot 10^{-3}$	0.0479
	1.00	5.00	0.035	$3.5 \cdot 10^{-3}$	0.0486
	5.00	970.7	2.0	$1.0 \cdot 10^{-3}$	0.0823

I dati relativi agli indici i-esimi da 1 a 6 sono stati utilizzati per ricavare l'incertezza composta relativa alle diluizioni di tutti gli standard e i campioni inquinati. Il campione inquinato a concentrazione 0.15 $\mu g/L$ comprende anche i dati 7-8, il campione inquinato a concentrazione 0.30 $\mu g/L$ i dati 9-10, il campione inquinato a 0.50 $\mu g/L$ i dati 11-12 e il campione inquinato 1.00 $\mu g/L$ i dati 13-14. Questi sono stati preparati per diluizione dello standard 5.00 $\mu g/L$. Il campione inquinato a 5.00 $\mu g/L$ è stato ricavato per diluizione di una soluzione acquosa a 50 $\mu g/L$ di MC-LR preparata a partire da uno standard a 9.707 $\mu g/mL$ e quindi per il calcolo sono stati considerati anche i dati degli indici 15-18.

Per valutare l'esattezza e il recupero, su ogni set di dati sono stati calcolati i seguenti parametri:

- Recupero (r%):

$$r\% = \frac{x}{x_m} \cdot 100 \quad (3.4.12)$$

dove x è il valore di concentrazione ricavato da ogni singola prova

- Recupero medio (r_m): media aritmetica dei $r\%$
- Incertezza relativa al materiale certificato (U_{CMR}):

$$U_{CMR} = \sqrt{u_{std}^2 + U_d^2} \quad (3.4.13)$$

- Incertezza di recupero (U_{rec})

$$U_{rec}/\mu g \cdot L^{-1} = \sqrt{\frac{\sigma^2}{n} \cdot U_{CMR}^2} \quad (3.4.14)$$

Con σ la deviazione standard sulle prove (Tabella 3.4.22)

- Incertezza di recupero relativa ($U_{rec\ rel}$)

$$U_{rec\ rel} = \frac{U_{rec}}{C} \quad (3.4.15)$$

- Differenza tra il valor vero e il valore medio trovato:

$$|C - x_m|/\mu g \cdot L^{-1} \quad (3.4.16)$$

- t di Student calcolato:

$$t = \frac{|C - x_m|}{U_{rec}} \quad (3.4.17)$$

Il recupero medio deve generalmente essere compreso tra 80 e 120% e l'esattezza viene valutata confrontando il t di Student calcolato con quello tabulato (t_c) a un livello di confidenza del 95%. Se $t < t_c$ il metodo viene considerato esatto e non è necessario moltiplicare il risultato per un fattore di recupero.

Tabella 3.4.26 – Esattezza e recupero

	$C / \mu g \cdot L^{-1}$	n	r_m (%)	U_{CMR}	$U_{rec\ rel}$	$ C - x_m / \mu g \cdot L^{-1}$	t	t_c (95%)	Valutazione esattezza
Standard	0.15	11	112	0.0664	0.444	0.0180	0.270	2.23	esatto
	0.40	11	104	0.0868	0.224	0.0166	0.185	2.23	esatto
	1.00	11	98	0.0912	0.105	0.0226	0.215	2.23	esatto
	2.00	11	142	0.229	0.121	0.8382	3.45	2.23	non esatto
	5.00	10	81	0.0438	0.0265	0.9338	7.05	2.26	non esatto
Campione inquinato	0.15	11	106	0.0620	0.414	0.0087	0.141	2.23	esatto
	0.30	11	114	0.0544	0.188	0.0486	0.860	2.23	esatto
	0.50	10	110	0.0480	0.104	0.0494	0.951	2.26	esatto
	1.00	11	101	0.0487	0.0493	0.0129	0.261	2.23	esatto
	5.00	10	90	0.0823	0.0179	0.5115	5.71	2.26	non esatto

Lo standard a concentrazione 2.00 $\mu g/L$ ha un recupero medio superiore al 120% ed è l'unico che non rientra nell'intervallo sopra citato. Il metodo si può definire esatto per concentrazioni uguali o

inferiori a 1.00 µg/L. Per concentrazioni superiori si riscontra un'inesattezza e quindi i risultati ottenuti dalle analisi per concentrazioni simili andranno moltiplicati per un fattore di recupero. Considerando i risultati sui recuperi, mediamente si è ottenuto un recupero del 106%.

Si è valutata anche l'incertezza relativa alla taratura per ciascuno standard e campione inquinato considerando ciascuna delle curve di calibrazione riportate nelle tabelle 3.4.3,13,14,16,18,20.

Considerando la retta di regressione derivante dalla curva, per ciascuno standard di calibrazione sono stati calcolati i seguenti parametri

- $y_{stimato}$: %B/B_o stimati dall'intercetta (b) e dalla pendenza (a) della retta di regressione.
- Sommatoria (S₁) degli scarti quadratici di %B/B_o e sommatoria (S₂) delle concentrazioni degli standard di calibrazione rispetto alla loro concentrazione media:

$$S_1 = \sum_i (y_{stimato}^i - y_i)^2 \quad (3.4.18)$$

$$S_2 / \mu g^2 \cdot L^{-2} = \sum_i (C_{Std} - C_m)^2 \quad (3.4.19)$$

con C_m pari a 1.71 µg/L.

- s_y/x

$$\frac{s_y}{x} = \sqrt{\frac{S_1}{n_p - 2}} \quad (3.4.20)$$

Con n_p pari a 5, ossia il numero di punti di calibrazione.

- Coefficiente A:

$$A = a^2 \cdot S_2 \quad (3.4.21)$$

Inoltre, per ciascuno standard e campione inquinato analizzato è stato calcolato lo scarto quadratico (s²) del valore di %B/B_o di ogni misurazione rispetto al valore medio di %B/B_o degli standard di calibrazione (y_m):

$$s_i^2 = (y_i - y_m)^2 \quad (3.4.22)$$

Tramite tutti questi, è stato possibile calcolare l'incertezza di taratura relativa (U_{tar rel}) i cui valori ottenuti sono riportati in tabella 3.4.27.

$$U_{tar\ rel} = \frac{\sqrt{S_3}}{x_m} \quad (3.4.23)$$

$$S_3 = \sum_i \left(\frac{s_y}{x} \cdot \sqrt{\frac{1 + \frac{1}{n_p} + \frac{s_i^2}{A}}{a}} \right)^2 \quad (3.4.24)$$

Tabella 3.4.27 – Incertezza di taratura

	C / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	n	a	b	S ₁	S ₂ / $\mu\text{g}^2\cdot\text{L}^{-2}$	s _y /x	A	S ₃	U _{tar rel}
Standard	0.15	11	-36.78	57.98	4.54	15.56	1.230	2.11·10 ⁴	0.0167	0.0700
	0.40	11	-34.57	60.41	12.27		2.022	1.86·10 ⁴	0.0502	0.0489
	1.00	11	-34.57	60.41	12.27		2.022	1.86·10 ⁴	0.0500	0.0208
	2.00	11	-34.02	70.38	14.74		2.216	1.80·10 ⁴	0.0631	0.0080
	5.00	10	-33.71	64.26	57.18		4.336	1.77·10 ⁴	0.2070	0.0112
Campione inquinato	0.15	11	-40.63	58.53	56.22		4.329	2.57·10 ⁴	0.1400	0.2143
	0.30	11	-34.57	60.41	12.27		2.022	1.86·10 ⁴	0.0414	0.0531
	0.50	10	-32.25	66.09	93.80		5.592	1.62·10 ⁴	0.3635	0.1097
	1.00	11	-40.63	58.53	56.22		4.329	2.57·10 ⁴	0.1363	0.0331
	5.00	10	-32.25	66.09	93.80		5.592	1.62·10 ⁴	0.3713	0.0136

I risultati ottenuti sulle incertezze si convogliano nell'incertezza estesa di misura (U_e) (Tabella 3.4.28).

$$U = \sqrt{U_{r\ rel}^2 + U_d^2 + U_{CMR}^2 + U_{tar\ rel}^2} \quad (3.4.25)$$

$$U_c = U \cdot \sqrt{\frac{n}{n_r}} \quad (3.4.26)$$

con n_r il numero di prove di routine, in questo caso imposto pari a 1.

$$U_{e\ rel} = U_c \cdot t_c \quad (3.4.27)$$

con t_c il t di Student tabulato per un livello di confidenza del 95% e un numero di gradi di libertà pari a v_{eff}; se v_{eff} > 10 allora t_c = 2.

$$v_{eff} = \frac{U^4}{\frac{U_{r\ rel}^4}{n-1} + \frac{U_{tar\ rel}^4}{n_p-2}} \quad (3.4.28)$$

$$U_e / \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} = U_{e\ rel} \cdot x_m \quad (3.4.29)$$

$$U_{e\%} = \frac{U}{x_m} \cdot 100 \quad (3.4.30)$$

L'incertezza di misura viene considerata accettabile se U_e > 2σ_r.

Tabella 3.4.28 – Incertezza di misura

	$C / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	n	U	U_c	v_{eff}	t_c	$U_{c\text{rel}}$	$U_c / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$U_{c\%}$	Accettabilità incertezza
Standard	0.15	11	0.0878	0.291	7	2.36	0.687	0.12	68.73	accettabile
	0.40	11	0.0865	0.287	21	2	0.574	0.24	57.39	accettabile
	1.00	11	0.0756	0.251	38	2	0.501	0.49	50.15	accettabile
	2.00	11	0.0837	0.277	736	2	0.555	1.58	55.50	accettabile
	5.00	10	0.0546	0.173	85	2	0.345	1.40	34.53	accettabile
Campione inquinato	0.15	11	0.2236	0.742	4	2.78	2.062	0.33	206.21	accettabile
	0.30	11	0.0876	0.291	20	2	0.581	0.20	58.13	accettabile
	0.50	10	0.1250	0.395	5	2.57	1.016	0.56	101.57	accettabile
	1.00	11	0.0593	0.197	31	2	0.393	0.40	39.32	accettabile
	5.00	10	0.0838	0.265	4194	2	0.530	2.38	52.99	accettabile

Riportando l'incertezza estesa percentuale ($U_{c\%}$) in funzione della concentrazione degli standard si ottiene il grafico in figura 3.4.10. L'incertezza tende a diminuire con l'aumentare della concentrazione. Si rileva una tendenza inversa per quanto riguarda lo standard 2.00 $\mu\text{g}/\text{L}$. Per i campioni inquinati invece l'andamento è altalenante. Nonostante tutto l'incertezza per ogni set di dati risulta accettabile. Sulla base dei risultati ottenuti per l'incertezza di misura è possibile esprimere il risultato sulle ripetute ad ogni concentrazione di standard e campioni inquinati come riportato in tabella 3.4.29.

Tabella 3.4.29 – Risultati prove

	$C / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$(x_m \pm U_c) / \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Standard	0.15	0.17 \pm 0.12
	0.40	0.42 \pm 0.24
	1.00	0.98 \pm 0.49
	2.00	2.84 \pm 1.58
	5.00	4.07 \pm 1.40
Campione inquinato	0.15	0.16 \pm 0.33
	0.30	0.35 \pm 0.20
	0.50	0.55 \pm 0.56
	1.00	1.01 \pm 0.40
	5.00	4.49 \pm 2.38

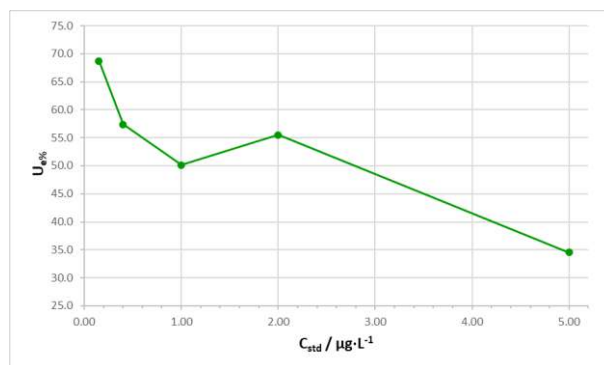


Figura 3.4.10 – Curva incertezza di misura per gli standard.

Si sono svolte poi delle prove di confronto tra campioni lisati e campioni tal quali al fine di comprendere se il processo di lisi effettuato tramite il kit Eurofins Abraxis QuikLyse™ potesse causare sensibili interferenze (Tabella 3.4.30). Questo kit è stato adottato su suggerimento del fornitore, che lo ha ideato come alternativa alla lisi tramite cicli di gelo e disgelo indicata nel metodo. Le prove sono state svolte su campioni provenienti da un impianto di trattamento delle acque e fontane pubbliche della zona del lago d’Iseo. Sono state prelevate due aliquote del campione sulle quali si è effettuata la lisi cellulare. Confrontando i risultati tra le due aliquote lisate, abbiamo una differenza tra i due valori compresa tra 0.01 e 0.15 $\mu\text{g}/\text{L}$ con deviazioni standard comprese tra 0.01 e 0.10 $\mu\text{g}/\text{L}$. Considerando l’incertezza estesa calcolata è possibile dire che le due misurazioni siano in accordo. Ci si aspetta che i campioni TQ abbiano una concentrazione uguale o inferiore a quella per i campioni con lisi. Osservando invece i risultati ottenuti per l’analisi TQ, il campione 4 ha una concentrazione superiore di 0.024 $\mu\text{g}/\text{L}$ rispetto al campione lisato. Se consideriamo il punto di prelievo, contrariamente a quanto atteso, l’acqua grezza ha un valore di concentrazione di MC-LR inferiore rispetto alle concentrazioni ottenute per i campioni 11 e 13 prelevati alla fine del trattamento di disinfezione.

Tabella 3.4.30 – Confronto risultati analisi su campioni lisati e campioni tal quali (TQ)

Campione	punto di prelievo	27/07/2022	28/07/2022	
		Lisi $C/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Lisi $C/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	TQ $C/\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
1	captazione (rubinetto: dopo UV)	<0,15	<0,15	<0,15
2	Fontana A	<0,15	<0,15	<0,15
3	Fontana B	0.215	0.202	<0,15
4	Fontana C	0.155	<0,15	0.179
5	Captazione (rubinetto lavandino: prima UV)	0.312	0.164	<0,15
6	Fontana E	0.196	<0,15	<0,15
7	Fontana F	0.167	<0,15	0.162
8	Fontana G	0.176	0.208	<0,15
9	Uscita serbatoio (rubinetto)	<0,15	0.164	0.165
10	Acqua grezza	0.170	<0,15	<0,15
11	uscita vasche distribuzione	0.245	0.180	<0,15
12	ingresso presa	0.156	0.210	<0,15
13	rubinetto uscita trattamento	0.251	0.205	<0,15

3.5 Risultati

L'LOQ risulta pari a 0.22 µg/L e siccome il metodo prevede un LOQ di 0.24 µg/L, per la verifica e l'accreditamento del metodo si è scelto di mantenere l'LOQ del metodo.

L'LOD risulta essere 0.14 µg/L ed è quindi accettabile secondo il metodo. Nonostante ciò, l'LOD si è preso pari a 0.15 µg/L in quanto questo risulta essere l'LOD imposto da come avviene l'elaborazione dei dati ad opera del Software, che per valori di concentrazione di MC-LR inferiori restituisce solo il risultato < 0.15 µg/L.

Sempre in base all'elaborazione dati effettuata, non possono essere rilevate concentrazioni superiori a 5.00 µg/L, infatti in questo caso il sistema restituisce il valore >5 µg/L. In relazione a quanto detto quindi il campo di misura risulta essere pari a 0.24 - 5.00 µg/L.

Le prove sui bianchi hanno restituito un valore di concentrazione di MC-LR <0.15 µg/L quindi è possibile affermare che non siano presenti interferenze dovute alla strumentazione o ai materiali impiegati.

Dalle prove di contaminazione, non si rileva la presenza di contaminazione reciproca tra pozzetti vicinali, in quanto i pozzetti contenenti i bianchi hanno portato a valori di concentrazione di MC-LR < 0.15 µg/L. Nonostante ciò, la concentrazione dello standard 1.00 µg/L impiegato risulta 0.75 ± 0.06 µg/L e quindi inferiore a quella nominale. Lo standard impiegato per fare queste prove era già stato utilizzato in analisi precedenti e conseguentemente era passato più volte dai 4 ± 2 °C della temperatura di conservazione alla temperatura ambiente. Questo potrebbe aver influito su un possibile deterioramento della soluzione e ciò sarà un futuro oggetto di indagine da parte del laboratorio di Acque Bresciane.

La lettura della micropiastra verrà effettuata dopo almeno cinque minuti dal termine dell'analisi in quanto è solo dopo questa tempistica che l'analisi risulta accettabile secondo tutti i parametri di controllo qualità. Nonostante in tutte le prove la concentrazione degli standard analizzati si discosta da quella nominale, risultano comunque in accordo tra una lettura e la successiva secondo l'incertezza di misura quindi non si ritiene questo parametro importante per lo scopo di questo tipo di prove.

Il laboratorio di Acque Bresciane ha ottenuto z-score conformi ($|z| \leq 2$) per i Proficiency Test effettuati negli ultimi quattro anni e su questi si registra un |BIAS%| di massimo 13.1% su concentrazioni inerenti al campo di misura dell'analisi. L'analisi risulta riproducibile.

Tramite prove ripetute su standard e campioni inquinati, è stato possibile valutare l'esattezza e il recupero delle analisi. Considerando che generalmente per un'analisi ELISA si ottengono recuperi tra l'80 e il 120%, solo lo standard a concentrazione 2.00 µg/L risulta fuori da questo range. L'esattezza è stata valutata tramite il test statistico di Student. Per concentrazioni di MC-LR superiori a 1.00 µg/L si riscontra un'inesattezza del metodo e quindi per tali livelli sarà necessario moltiplicare il risultato ottenuto per un fattore di recupero. Questo risultato è insolito in quanto, considerando anche la sensibilità e specificità dell'ELISA, ci si aspetta una maggior incidenza di inesattezza per concentrazioni vicine all'LOQ. Per i campioni su cui si è riscontrata inesattezza sarà possibile ripetere l'analisi per verificare effettivamente questo risultato.

La curva di calibrazione utilizzata per l'elaborazione dei risultati è una curva punto-a-punto, conseguentemente non è necessario valutarne il parametro di linearità, in quanto quella cui ci si trova di fronte non può essere considerata una retta. Nonostante ciò, per ciascuna curva è stato comunque riportato il coefficiente di correlazione della retta di regressione potenzialmente individuata dai cinque punti di taratura. Su otto curve di calibrazione qui riportate, mediamente si ha un valore di R^2 pari a 0.980. Se si considera che il metodo prevede che il coefficiente di correlazione sia maggiore o uguale a 0.980, il 62.5% delle curve soddisfano questo parametro.

Con i dati ottenuti dalle prove effettuate sono state calcolate incertezza di taratura, incertezza di ripetibilità, incertezza relativa alle soluzioni standard e incertezza composta relativa alle diluizioni. Queste sono state utilizzate per valutare l'incertezza di misura espressa come incertezza estesa, U_e , o come incertezza estesa percentuale, $U_{e\%}$. L'incertezza trovata risulta compresa nell'ampio range tra il 30 e il 210%. Nonostante ciò, l'incertezza risulta accettabile per ogni livello di concentrazione in quanto è maggiore di almeno due volte lo scarto tipo di ripetibilità σ_r . Considerando esclusivamente gli standard di MC-LR, si nota come l'incertezza di misura tenda a diminuire con l'aumentare della concentrazione (Figura 3.4.10), come ci si può aspettare. Si ha un'inversione di tendenza per quanto riguarda lo standard a 2.00 µg/L. Considerando che per questo standard il metodo non è esatto e che risulta anche avere lo scarto tipo di ripetibilità più alto rispetto agli altri standard di calibrazione e campioni inquinati, sarà necessario ripetere le prove su questo livello di concentrazione prima di procedere con l'accreditamento del metodo. L'andamento dell'incertezza di misura per i campioni inquinati è altalenante. Tenuto conto che questi sono stati ottenuti inquinando aliquote di campioni che avessero dato risultati di concentrazioni < 0.15 µg/L con soluzioni standard, è possibile che questi campioni contenessero tracce di microcistine non rivelabili che potrebbero essersi sommate al quantitativo contenuto negli standard o che ci sia stato un effetto dovuto alla matrice. Le interferenze dovute alla matrice non sono state esaminate da questo studio perché, come dice il metodo stesso, la

variabilità dei composti che si possono trovare nei campioni acquosi è talmente elevata che risulta complesso escluderle tutte. L'indagine sulle possibili interferenze dovute alla matrice potrà essere svolta a discrezione dal laboratorio di Acque Bresciane qualora si presentino evidenti incongruenze tra i risultati e lo storico delle analisi. Calcolata dunque l'incertezza di misura per ciascun set di dati, i risultati delle prove ripetute vengono espressi come in tabella 3.4.29.

I campioni devono essere sottoposti a lisi cellulare per poter rilevare la quantità totale di microcistine presenti, come indicato nel metodo Ohio EPA Method 701.0 Version 2.4 2021³³. Per fare ciò, su consiglio del fornitore Eurofins Abraxis, il laboratorio di Acque Bresciane ha adottato il kit QuikLyse™ per effettuare la suddetta lisi. Dalle prove di confronto tra campioni lisati e non, ci si aspetta che il valore di concentrazione per il campione tal quale sia inferiore a quello per lo stesso campione sottoposto a lisi. Tutti i campioni tranne il numero 4 rispettano questo presupposto. Nonostante ciò, i risultati sono confrontabili se si considera l'incertezza di misura per quei livelli di concentrazione. Il fatto che campioni prelevati dagli ultimi stadi di un impianto di trattamento dell'acqua di lago abbiano concentrazioni di MC-LR superiori rispetto all'acqua grezza in ingresso all'impianto potrebbe essere dovuta a un rilascio delle microcistine a causa della lisi cellulare involontariamente provocata da trattamenti adottati. I risultati ottenuti dimostrano che senza effettuare la lisi, si corre il rischio di non rilevare la possibile presenza di microcistine intracellulari che possono risultare egualmente dannose per la salute umana.

4. Tecnica HPLC/UV

4.1 Reagenti, apparato HPLC, fase stazionaria e fasi mobili

Sono state condotte delle prove utilizzando un HPLC Agilent 1200 provvisto di:

- porta-eluenti;
- Degasser G1322A, Agilent;
- Quadri Pump G1311A, Agilent;
- Rilevatore DAD G1315D, Agilent.

La colonna era una SB-C18 RP, 2.7 μm , 4.6 x 100 mm, Poroshell 120 della Agilent. Sono stati sperimentati tre diversi programmi di eluizione in gradiente, con flusso 1 mL/min identificati nel modo seguente:

- Metodo 1¹: eluente A-0.05% TFA in acqua ultrapura grado 1, eluente B- 0.05% TFA in acetonitrile. 0 min 20% B, 20 min 100% B, 25 min 100% B, 30 min 20% B;
- Metodo 2¹: eluente A-0.05% TFA in acqua ultrapura grado 1, eluente B- 0.05% TFA in acetonitrile. 0 min 30% B, 10 min 35% B, 40 min 70% B, 42 min 100% B, 44 min 100% B, 46 min 30% B, 55 min 30% B;
- Metodo 3¹⁶: eluente A-0.05% TFA in acqua ultrapura grado 1, eluente B- 0.05% TFA in acetonitrile. 0 min 20% B, 25 min 65% B, 27 min 65% B, 28 min 20% B, 45 min 20% B.
- Metodo 4: eluente A-0.05% TFA in acqua ultrapura grado 1, eluente B- 0.05% TFA in acetonitrile. 0 min 20% B, 17 min 100% B, 27 min 100% B, 30 min 20% B;

Queste condizioni di analisi sono state scelte in modo tale da essere in accordo con il metodo ISO 20179:2005²⁶ così da permettere all'Azienda Acque Bresciane di poter valutare l'effettuazione di una validazione futura del metodo una volta ottenuta la strumentazione necessaria ed a uso esclusivo del suo laboratorio.

L'acetonitrile e il TFA grado HPLC sono stati acquistati da Merck e l'acqua ultrapura grado 1 è stata purificata tramite sistema Milli-Q[®] (Millipore).

Lo standard di calibrazione utilizzato è una soluzione in metanolo di MC-LR 10 $\mu\text{g/mL}$ acquistata da Merck, con concentrazione effettiva certificata tramite analisi HPLC $9.707 \pm 0.020 \mu\text{g/mL}$. Tramite questo standard sono state anche preparate delle soluzioni in acqua ultrapura grado 2 sterile a livelli di concentrazione pari a 1 mg/L, 200 $\mu\text{g/L}$, 100 $\mu\text{g/L}$ e 50 $\mu\text{g/L}$. Dalla soluzione a 50 $\mu\text{g/L}$, per diluizione sono state preparate altre soluzioni a concentrazioni di 25 $\mu\text{g/L}$, 10 $\mu\text{g/L}$, 5 $\mu\text{g/L}$, 2 $\mu\text{g/L}$,

1 µg/L, 0.2 µg/L e 0.01 µg/L. Su queste soluzioni sono state effettuate tutte le prove presentate in questo studio. Per ogni analisi sono stati analizzati 20 µL di campione.

La rivelazione UV è stata eseguita tramite il rivelatore DAD sopra citato, a una lunghezza d'onda di 238 nm e 222 nm, per le ragioni illustrate al sottocapitolo 2.3. La microcistina-LR dovrebbe eluire attorno a un tempo compreso tra 10-20 min^{1,27}.

4.2 Analisi

Tramite il metodo 1, si sono effettuate misurazioni sullo standard di calibrazione, sulle soluzioni preparate sopra indicate e su un bianco costituito da una miscela 50:50 acqua ultrapura grado 1 : metanolo, preparato in modo da avere una matrice simile a quella di tali soluzioni. Oltre a questi sono stati acquisiti i cromatogrammi di tutti gli standard di calibrazione del kit ELISA e di un bianco di acqua ultrapura grado 1 con il metodo 4 e del solo standard 5.00 µg/L e del bianco con il metodo 2 e 3. Si riportano di seguito i risultati più significativi (Figure 4.2.1-11).

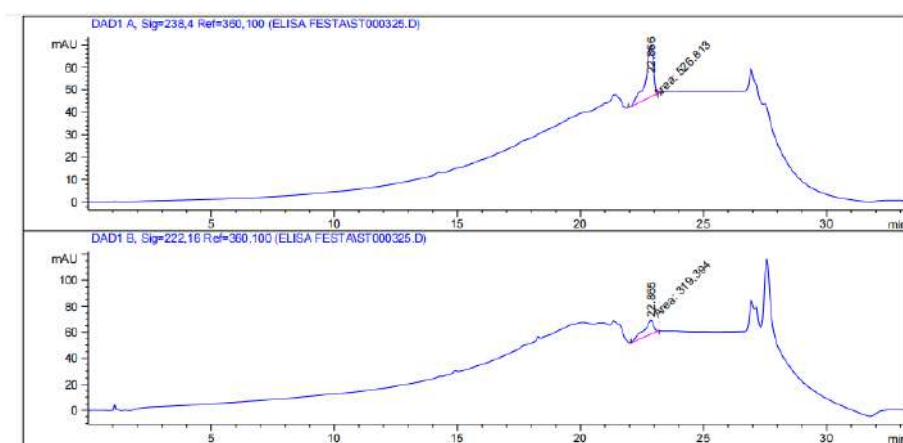


Figura 4.2.1 – Cromatogrammi HPLC a 238 e 222 nm metodo 1, bianco 50:50 acqua:metanolo

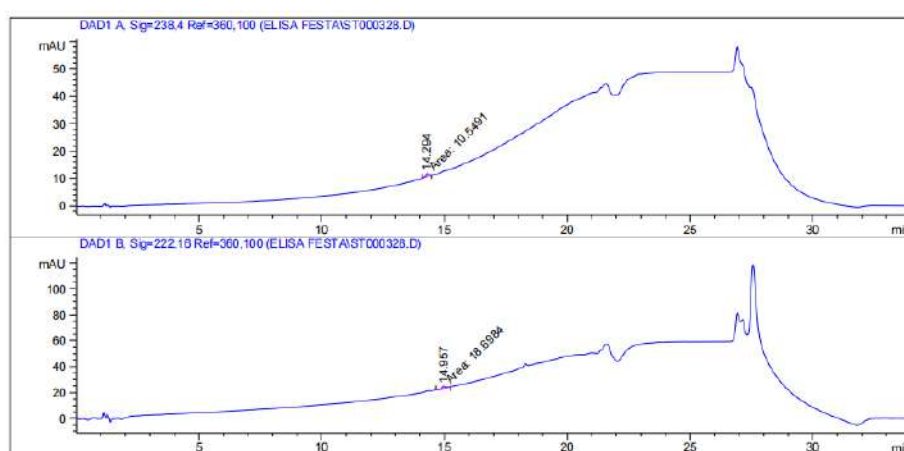


Figura 4.2.2 – Cromatogrammi HPLC a 238 e 222 nm metodo 1, soluzione MC-LR 50 µg/L

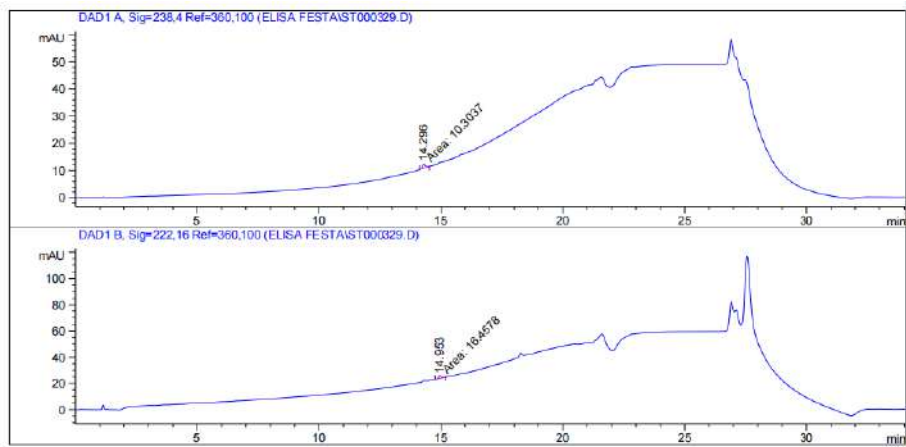


Figura 4.2.3 – Cromatogrammi HPLC a 238 e 222 nm metodo 1, soluzione MC-LR 100 µg/L

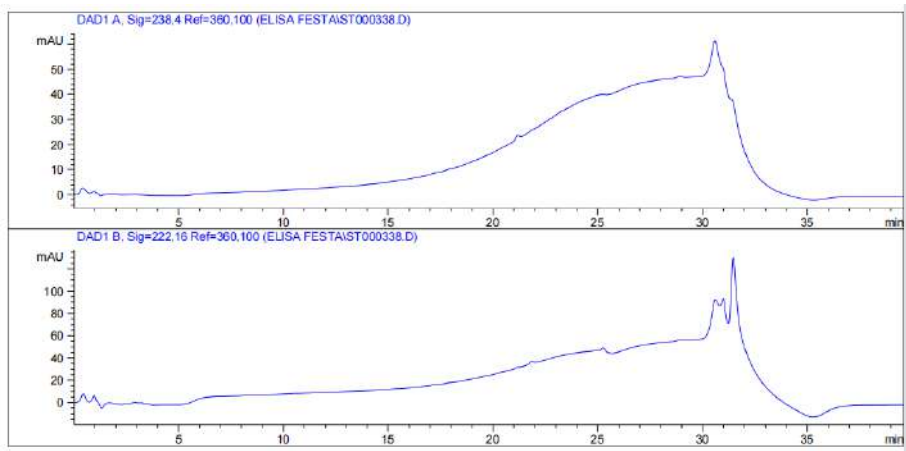


Figura 4.2.4 – Cromatogrammi HPLC a 238 e 222 nm metodo 1, soluzione MC-LR 1 mg/L

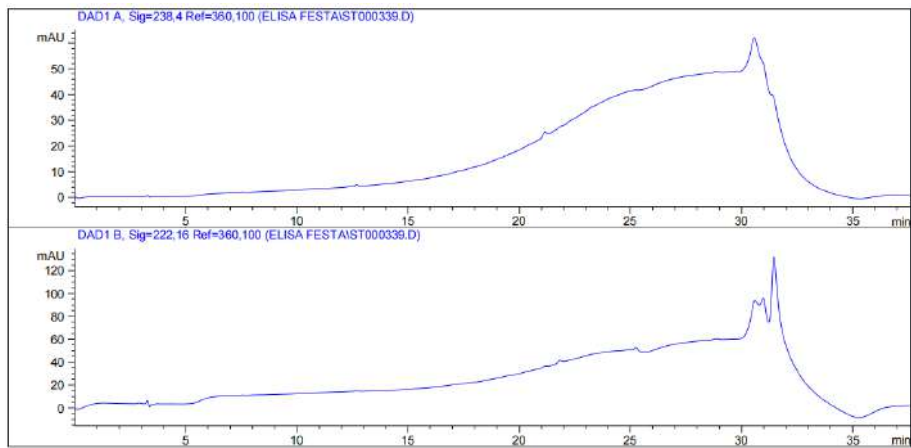


Figura 4.2.5 – Cromatogrammi HPLC a 238 e 222 nm metodo 1, standard di calibrazione MC-LR 9.707 mg/L

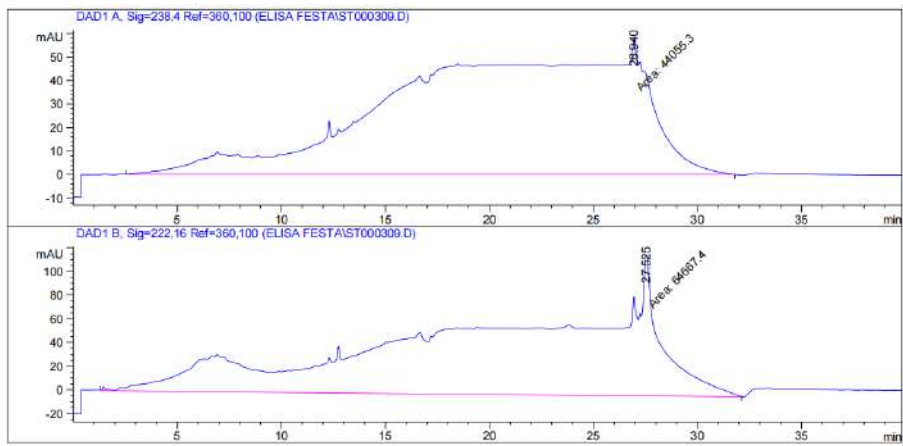


Figura 4.2.6 – Cromatogrammi HPLC a 238 e 222 nm metodo 4, bianco di acqua ultrapura grado 1

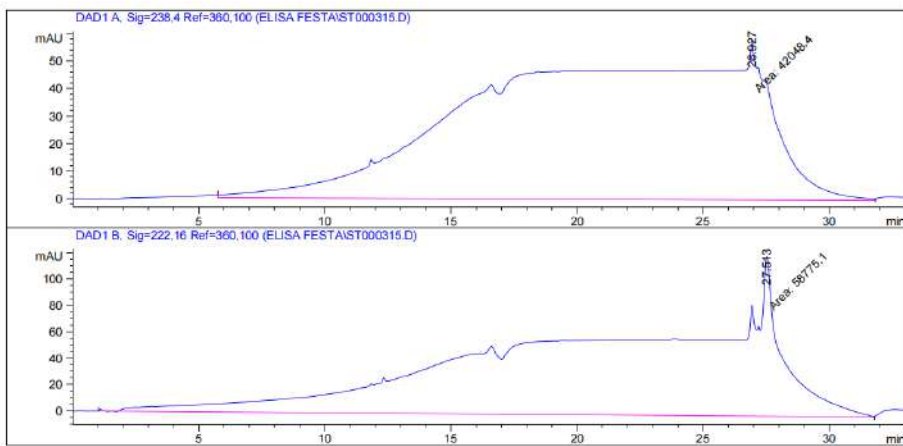


Figura 4.2.7 – Cromatogrammi HPLC a 238 e 222 nm metodo 4, Standard microcistine 5.00 µg/L del kit ELISA

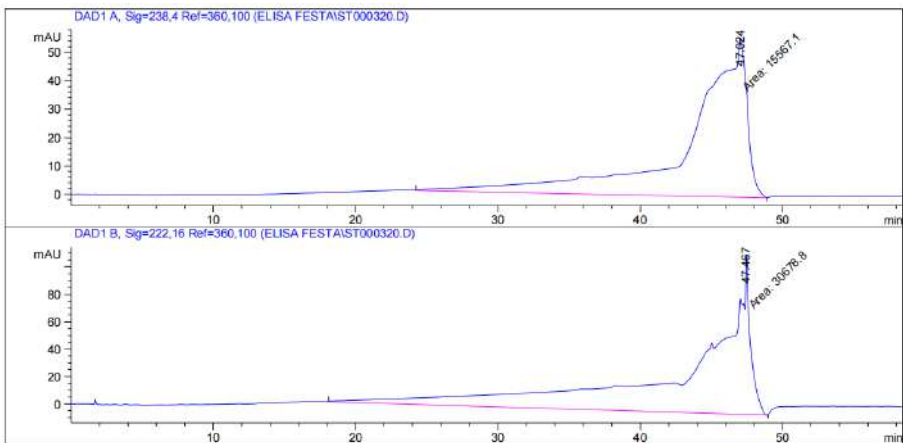


Figura 4.2.8 – Cromatogrammi HPLC a 238 e 222 nm metodo 2, bianco di acqua ultrapura grado 1

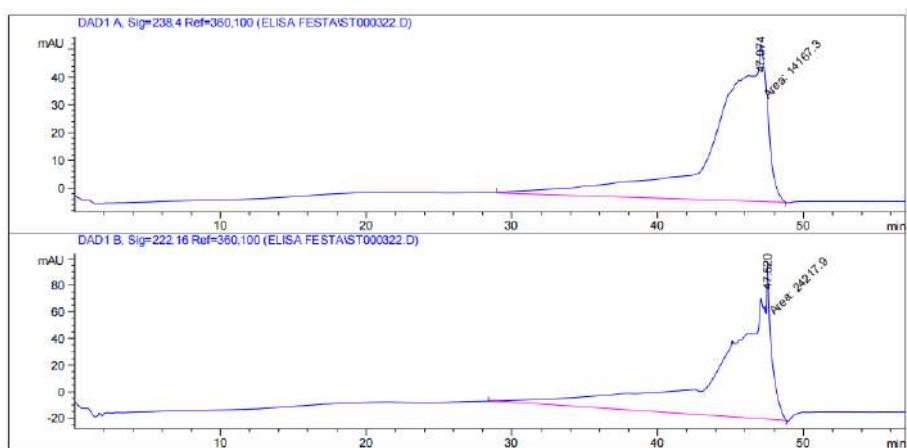


Figura 4.2.9 – Cromatogrammi HPLC a 238 e 222 nm metodo 2, Standard microcistine 5.00 µg/L del kit ELISA

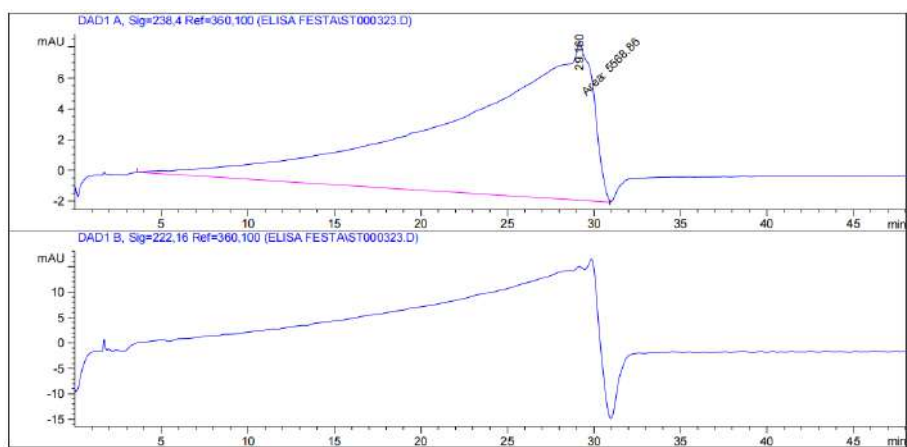


Figura 4.2.10 – Cromatogrammi HPLC a 238 e 222 nm metodo 3, bianco di acqua ultrapura grado 1

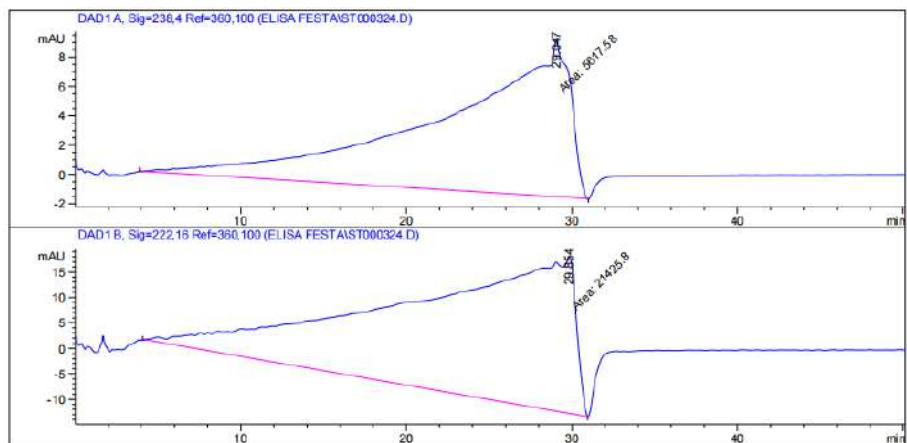


Figura 4.2.11 – Cromatogrammi HPLC a 238 e 222 nm metodo 3, Standard microcistine 5.00 µg/L del kit ELISA

Confrontandosi con i bianchi e con lo standard di calibrazione, in nessuno dei cromatogrammi per nessuno dei metodi di eluizione adottati si nota la presenza di un picco dovuto all'eluizione della MC-LR. Non è stato possibile proseguire con le indagini a causa di un guasto alla strumentazione.

4.3 Risultati

I metodi HPLC/UV applicati non sono stati in grado di rivelare la MC-LR presente nei campioni analizzati. Questo potrebbe essere dovuto all'elevato LOD della tecnica stessa che, per ovviare a questo ostacolo, viene sovente accoppiata a processi di pre-concentrazione dei campioni con SPE^{1,10,22} o MSPE^{10,25}. Nonostante ciò, non è stato rilevato nemmeno lo standard di calibrazione iniettato TQ in colonna, il che potrebbe essere dovuto a vari fattori come l'elevata temperatura ambientale cui è avvenuta la misura (tra i 25 e i 33°C), la ritenzione in colonna della molecola, l'alterazione degli eluenti a causa delle temperature ambientali e/o il guasto alla strumentazione che avrebbe potuto essere già in corso, ma non essere stato ancora rilevato dall'operatore al momento delle misurazioni.

5. Conclusioni

Le microcistine sono cianotossine dannose per la salute dell'uomo in quanto epatotossine e anche sospette sostanze cancerogene. In quanto metaboliti dei cianobatteri, si trovano disperse nell'ambiente in cui questi vivono, ossia in acqua, andando a minare la qualità delle risorse idriche nonché i relativi processi di trattamento. La presenza di queste tossine nelle acque superficiali destinate al consumo umano è un problema emergente in tutto il mondo a causa dell'aumento di fenomeni come le CyanoHABs. Questi eventi sono favoriti da vari fattori come, ad esempio, il riscaldamento globale e le ingenti attività agricole ed industriali del territorio, che rendono le risorse idriche come i bacini lacustri potenzialmente soggetti a fenomeni di eutrofizzazione. Il rischio di esposizione per l'uomo deriva dall'ingestione di acque contaminate o per contatto diretto con la pelle. Per questi motivi, nella Gazzetta ufficiale dell'Unione europea del 23 dicembre 2020 è stata pubblicata la nuova Direttiva (UE) 2020/2184⁹ sulla qualità delle acque destinate al consumo umano dove, assecondando le linee guida presentate dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS)⁸, è stata imposta una concentrazione limite non superiore ad 1 µg/L di MC-LR per le acque destinate al consumo umano, in quanto quest'ultima è la variante di microcistine più diffusa e tossica.

In collaborazione con l'azienda Acque Bresciane, si è cercato, dunque, di individuare metodica avente le prestazioni migliori per la valutazione del parametro microcistina-LR in matrice acquosa con conseguente avviamento del processo di verifica del metodo di prova scelto secondo le norme dell'ente di accreditamento ACCREDIA, confrontando le tecniche HPLC, LC-MS ed ELISA.

Nonostante queste tecniche riescano a dare risultati generalmente in accordo tra loro, la tecnica LC-MS è quella con le caratteristiche prestazionali migliori grazie alla capacità di raggiungere limiti di rivelabilità e quantificazione anche nell'ordine delle decine di ng/L e alla possibilità di effettuare speciazione e quantificazione di vari congeneri anche strutturali di microcistine. Questa tecnica, quindi, è dotata della specificità e sensibilità necessarie per l'analisi di campioni di acqua potabile così come di matrici complesse e inusuali. Visti però gli ingenti costi a livello di spese e tempistiche atte a implementare la tecnica LC-MS, l'ELISA risulta essere una valida alternativa meno dispendiosa a livello economico, ma sempre con tempi di analisi lunghi e la necessità di impiegare personale specializzato. La tecnica HPLC può raggiungere limiti di rivelabilità simili a quelli dell'ELISA se accoppiata con processi di pre-concentrazione dei campioni e risente meno delle interferenze della matrice come l'LC-MS, ma non è in grado di differenziare tra le varianti strutturali di microcistine.

Applicando la verifica del metodo di prova Ohio EPA Method 701.0 Version 2.4 2021³³, il saggio ELISA si è dimostrata una tecnica efficace per la determinazione della microcistina-LR matrice

acquosa. L'LOD di 0.15 µg/L, l'LOQ di 0.24 µg/L e il campo di misura compreso tra 0.24 e 5.00 µg/L rendono il metodo adatto a verificare la conformità rispetto al limite di 1.00 µg/L imposto per la concentrazione di MC-LR nelle acque destinate al consumo umano. Le prove sui bianchi non hanno dato adito alla presenza di interferenze dovute ai materiali e alla strumentazione utilizzati per l'analisi e si è data prova di come non si verifichi contaminazione tra pozzetti vicini. Dai Proficiency Test effettuati, l'analisi risulta riproducibile con un %BIAS massimo del 13.1% per concentrazioni comprese nel campo di misura. Considerando le prove effettuate su standard e campioni inquinati si è osservato che quasi tutti i recuperi rientrano nell'intervallo 80-120% generalmente atteso per un saggio ELISA, con una media su tutti i recuperi del 106%. Il metodo è dotato di esattezza per concentrazioni uguali o inferiori a 1.00 µg/L. Per i restanti livelli di concentrazione del campo di misura sarà necessario correggere i risultati tramite un fattore di recupero e sarà possibile verificare con ulteriori analisi se effettivamente si goda o meno di esattezza per tali concentrazioni. Per quanto riguarda la linearità della risposta, tenendo conto di quanto precedentemente affermato sulla curva di calibrazione punto-a-punto, si sono ottenuti comunque dei buoni risultati visto il coefficiente di correlazione medio di 0.980. L'incertezza di misura ha valori compresi tra il 30% e il 210%, ma risulta comunque accettabile in quanto migliorativa. L'incertezza di misura tende a diminuire con l'aumentare della concentrazione di MC-LR degli standard in esame, tranne per lo standard 2.00 µg/L che per questo andrebbe rianalizzato. La lisi effettuata tramite kit QuikLyse™ non ha mostrato essere fonte di interferenze con l'analisi, ma ha messo in evidenza il fatto che senza lisare il campione si rischia di non accorgersi della potenziale presenza di microcistine intracellulari ed egualmente pericolose.

Le prove effettuate con l'HPLC/UV non hanno rivelato la presenza di MC-LR nei campioni e nello standard di calibrazione iniettati in colonna. Il motivo potrebbe essere dovuto al fatto che la concentrazione di tali soluzioni risultasse inferiore all'effettivo LOD della tecnica che viene per l'appunto spesso preceduta da degli step di pre-concentrazione dei campioni tramite SPE o MSPE, o da altri fattori quali l'elevata temperatura del laboratorio e la possibile ritenzione in colonna della molecola.

6. Ringraziamenti

Vorrei dedicare questa pagina del presente elaborato alle persone che, con il loro supporto, mi hanno aiutato nella sua redazione.

Ringrazio il mio relatore, il Professor Luigi Falciola, e la mia correlatrice, l'Ingegnere Marieta Hahn, per avermi permesso di approfondire le mie conoscenze.

Un ringraziamento speciale va a tutto lo staff dell'azienda Acque Bresciane, in cui ho svolto il tirocinio complementare alla redazione di questo elaborato, per l'ospitalità e per le competenze che mi hanno trasmesso. A tal proposito non posso non menzionare la Dottoressa Laura Binetti, per aver seguito ogni mio passo nel condurre questo studio che ha portato a un grande arricchimento della mia figura professionale, per averne condiviso i momenti migliori e peggiori e per avermi dato consigli preziosi per la realizzazione di questo lavoro.

Ringrazio la mia famiglia, senza la quale non avrei potuto intraprendere questo percorso di studi e che mi è sempre stata vicina nei momenti di sconforto.

Agli amici e ai colleghi di corso, per aver sopportato i miei sfoghi e per avermi donato momenti di serenità e spensieratezza.

Infine, vorrei dedicare questo traguardo a me stessa, per i sacrifici fatti e per ricordare che bisogna “sforzarsi sempre di vedere ciò che splende dietro le nuvole più nere”.

7. Bibliografia

1. Thuret-Benoist H., Pallier V., Feuillade-Cathalifaud G. Quantification of microcystins in natural waters by HPLC-UV after a pre-concentration step: validation of the analytical performances and study of the interferences. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2019;72(103223).
2. Lucentini L., Ottaviani M. per il “Gruppo nazionale per la gestione del rischio cianobatteri in acque destinate a consumo umano”. Cianobatteri in acque destinate al consumo umano. Stato delle conoscenze per la valutazione del rischio. Volume 1. *Rapporti ISTISAN 11/35 Pt1.* 2011;1.
3. Petrachi S., Tesi di laurea, Valutazione Della Presenza Di Microcistine in Acque Stanganti in Aree Della Toscana Del Nord. Università di Pisa; Anno Accademico 2014/2015; Pagine 1-18.
4. Codd G.A., Morrison L.F., Metcalf J.S. Cyanobacterial toxins: Risk management for health protection. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;203:264-272.
5. Lucrentini L., Patriarca M. per la Sottocommissione del Comitato permanente di Studio sulle Acque del Ministero della Salute. ISS.CBA.053.REV00 Microcistine: metodo LC-MSMS. *Rapporti ISTISAN 19/7.* Published online 2019.
6. Ottaviani M., Bonadonna L. per “Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria”. Microcistine: Metodo per cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS) ISS.CBA.044.REV00. *Rapporti ISTISAN 07/31.* Published online 2007.
7. Ottaviani M., Bonadonna L. per il Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria. Microcistine: metodo immunoenzimatico ISS.BGA.044.REV00. *Rapporti ISTISAN 07/31.* Published online 2007.
8. Guidelines for drinking water quality. Addendum to Vol.2, Health Criteria and Other Supporting Information, 2nd ed. Published online 1998.
9. Direttiva (UE) 2020/2184 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2020. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, L 435.* Published online December 23, 2020:1-62.
10. Massey I.Y., Wu P., Wei J., Luo J., Ding P., Wei H., Yang F. A mini-review on detection methods of microcystins. *Toxins (Basel).* 2020;12(641).

11. Roegner A.F., Brena B., González-Sapienza G., Puschner B. Microcystins in potable surface waters: Toxic effects and removal strategies. *Journal of Applied Toxicology*. 2014;34:441-457.
12. Zhang H., Li B., Liu Y., Chuan H., Liu Y., Xie P. Immunoassay technology: Research progress in microcystin-LR detection in water samples. *J Hazard Mater*. 2022;424(127406).
13. Bulc Rozman K., Jurič D.M., Šuput D. Selective cytotoxicity of microcystins LR, LW and LF in rat astrocytes. *Toxicol Lett*. 2017;265:1-8.
14. Pouria S., de Andrade A., Barbosa J., Cavalcanti R.L., Barreto V.T., Ward C.J., Preiser W., Poon G.K., Neild G.H., Codd G.A. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet*. 1998;352:21-26.
15. Ward C.J., Codd G.A. Comparative toxicity of four microcystins of different hydrophobicities to the protozoan, *Tetrahymena pyriformis*. *J Appl Microbiol*. 1999;86(5):874-882.
16. Spoo L., Vesterkvist P., Lindholm T., Meriluoto J. Screening for cyanobacterial hepatotoxins, microcystins and nodularin in environmental water samples by reversed-phase liquid chromatography- electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2003;1020:105-119.
17. Kamp L., Church J.L., Carpino J., Faltin-Mara E., Rubio F. The effects of water sample treatment, preparation, and storage prior to cyanotoxin analysis for cylindrospermopsin, microcystin and saxitoxin. *Chem Biol Interact*. 2016;246:45-51.
18. Direttiva 98/83/CE Del Consiglio Del 3 Novembre 1998 Concernente La Qualità Delle Acque Destinate al Consumo Umano. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea*, L 330. December 5, 1998.
19. Decreto Legislativo 31/2001, *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana* Febbraio 2, 2001.
20. UNI CEI EN ISO-IEC 17025-2018. *Requisiti generali di prova e taratura*; 2018.
21. Documento ACCREDIA RT-08-Rev.05. *Prescrizioni per l'accreditamento Dei Laboratori Di Prova*; 2021.
22. Kumar P., Rautela A., Kesari V., Szlag D., Westrick J., Kumar S. Recent developments in the methods of quantitative analysis of microcystins. *J Biochem Mol Toxicol*. 2020;34(22582).

23. Bateman K., Thibault P., Douglas D., White R. Mass Spectral Analyses of Microcystins from Toxic Cyanobacteria Using On-Line Chromatographic and Electrophoretic Separations. *Journal of Chromatography A*. 1995;712:253-268.
24. Jiang C., Hu P.B., Tarun A. Application Note, Environmental: Quantitation of Microcystins in Water by Direct Injection and Online SPE LC/MS/MS Systems. *Agilent Technologies Inc*. 2018.
25. Lian L.L., Guo T.X., Wu Y.Q., Jin L., Lou D.W., Sun D.Z. Determination of Microcystin-LR in Environmental Water by Magnetic Solid Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. 2015;43(12):1876-1881.
26. Technical Committee ISO/TC 147/SC 2. *Method ISO 20179:2005 Water quality - Determination of microcystins - Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection*. 2005:1-17.
27. Spoo L., Karlsson K., Meriluoto J. High-Performance Liquid Chromatographic Separation of Microcystins and Nodularin, Cyanobacterial Peptide Toxins, on C₁₈ and Amide C₁₆ Sorbents. *Journal of Chromatography A*; 2001;909:225-236.
28. Labster theory. *Tipi di ELISA*. www.theory.labster.com.
29. JoVE Science Education Database. ELISA Assays: Indirect, Sandwich and Competitive. *Immunology*. JoVE, Cambridge, MA; 2022.
30. JoVE Science Education Database. The ELISA Method. *Basic Methods in Cellular and Molecular Biology*. JoVE, Cambridge, MA; 2022.
31. Perrotta M.G. ELISA Funzionamento e trucchi del mestiere. *Tecna S.r.l.*;2018.
32. Fastner J., Codd G.A., Metcalf J.S., Voitke P., Wiedner C., Utkilen H. An international intercomparison exercise for the determination of purified microcystin-LR and microcystins in cyanobacterial field material. *Anal. Bioanal. Chem*. 2002;374:437-444.
33. *Ohio EPA Total (Extracellular and Intracellular) Microcystins - ADDA by ELISA Analytical Methodology*. OHIO EPA METHOD 701.0 Version 2.4; 2021.
34. EURACHEM. *The fitness for purpose of analytical method*. II edition; 2014.
35. Documento ACCREDIA DT-0002. *Guida per la valutazione e la espressione dell'incertezza nelle misurazioni*; 2000.

36. Documento ACCREDIA DT-0002/6. *Guida al calcolo della ripetibilità di un metodo di prova ed alla sua verifica nel tempo*; 2000.
37. Documento ACCREDIA DT-0002/4. *Esempi applicativi di valutazione dell'incertezza nelle misurazioni chimiche*; 2000.
38. Documento ACCREDIA DT-0002/3. *Avvertenze per la valutazione e la espressione dell'incertezza nelle misurazioni*; 2000.
39. ARPA Emilia-Romagna. *Linee guida per la validazione dei metodi analitici e per il calcolo dell'incertezza di misura*; 2002.
40. Manuale UNICHIM 179/2. *Valutazione della precisione (stretta ed intermedia) di un metodo analitico eseguito in un unico laboratorio con più operatori*; 2011.
41. Manuale UNICHIM 179/3. *Valutazione della ripetibilità stretta ed intermedia ad un livello dell'analita con un operatore in diversi tempi*; 2011.
42. Manuale UNICHIM 179/1. *Valutazione della precisione (ripetibilità stretta) di un metodo analitico eseguito in un unico laboratorio da un solo operatore di un unico strumento in un breve intervallo di tempo*; 2011.
43. Manuale UNICHIM 179/0. *Linee guida per la validazione di metodi analitici nei laboratori chimici*; 2011.