

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Assicurazione della qualità
nel laboratorio biologico
per il controllo ufficiale degli alimenti**

Corso tenuto presso
l'Istituto Superiore di Sanità
Roma, 7-8 novembre 1996

A cura di
Dario De Medici e Leucio Orefice
Laboratorio Alimenti

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

97/28

Istituto Superiore di Sanità

Assicurazione della qualità nel laboratorio biologico per il controllo ufficiale degli alimenti. Corso tenuto presso l'Istituto Superiore di Sanità. Roma, 7-8 novembre 1996.

A cura di Dario De Medici e Leucio Orefice

1997, iii, 157 p. Rapporti ISTISAN 97/27

Le monografie affrontano diversi aspetti dell'organizzazione e delle procedure adottate nei laboratori preposti al controllo ufficiale degli alimenti: struttura e ambiente del laboratorio e dello stabulario, personale, gestione e conservazione dei campioni, la qualità dei materiali e delle apparecchiature, programmi di controllo di qualità intra- e inter-laboratorio, criteri e metodi analitici, valutazione del rischio biologico e gestione della documentazione. È incluso un contributo relativo alla valutazione statistica sugli aspetti microbiologici del controllo degli alimenti. In appendice si riportano considerazioni sui limiti relativi all'applicazione del metodo scientifico.

Parole chiave: Microbiologia degli alimenti

Istituto Superiore di Sanità

Quality assurance in official biological food control laboratories. Course held at the Istituto Superiore di Sanità. Rome, November 7-8, 1996.

Edited by Dario De Medici and Leucio Orefice

1997, iii, 157 p. Rapporti ISTISAN 97/27 (in Italian)

Monographs deals with different aspects of organisation and procedures adopted in official food control laboratories: design and environment of the laboratory and animal unit laboratory, staff, samples handling and disposal, equipment and reagents, internal and external quality control programmes, criteria and methodologies, risk assessment of biological agents in a laboratory, laboratory documentation management. Some questions concerning statistical evaluation of biological aspects of food control are also included. In appendix, considerations on limits of the general scientific method are reported.

Key words: Food microbiology

INDICE

Presentazione		
A. Stacchini.....	p	iii
Il programma per l'assicurazione di qualità: concetti generali		
L. Toti.....	«	1
Organizzazione struttura e requisiti del laboratorio preposto al controllo microbiologico degli alimenti.		
L. Croci.....	«	8
Condizioni ambientali e misure da adottare per una corretta esecuzione dei saggi biotossicologici.		
L. Fenicia.....	«	19
Gestione e conservazione dei campioni da sottoporre ad analisi microbiologica.		
B. Pasolini.....	«	31
Assicurazione della qualità dei materiali e delle apparecchiature di laboratorio.		
D. De Medici, M. Gianfranceschi.....	«	38
Prove intra e interlaboratorio (PIVRAM)		
P. Aureli.....	«	57
Controllo microbiologico: criteri e metodi analitici		
A.M. Ferrini.....	«	71
Valutazione del rischio microbiologico.		
G. Franciosa.....	«	86
Applicazioni statistiche per la valutazione dei dati analitici.		
F. Taggi.....	«	93
Gestione e registrazione dei dati analitici e dei documenti di laboratorio.		
M. Balestrieri, D. De Medici.....	«	113
Appendice		
Considerazioni sul metodo scientifico.		
L. Orefice.....	«	131

Introduzione

Recentemente il Laboratorio Alimenti dell'ISS ha elaborato le linee guida per l'assicurazione della qualità nel laboratorio chimico e biologico, linee che recepiscono le esigenze di adeguamento alle norme europee EN 45001. Tali norme riportano tra l'altro i criteri generali per il funzionamento dei laboratori di prova: esse forniscono indicazioni per quanto riguarda la gestione e l'organizzazione di tali laboratori.

L'adozione di un programma di assicurazione della qualità per i laboratori, qualora sia correttamente strutturato, conduce ad una migliore utilizzazione delle risorse in termini di tempo e di disponibilità economica. Infatti un tale programma riduce la necessità della ripetizione delle analisi, fornisce dati ottenuti attraverso procedure che assicurano la condivisibilità dei risultati, prevede un addestramento del personale con adozione di procedure scritte al fine di evitare errori, identifica ciò che è necessario fornire al gruppo operativo al fine di ottenere un servizio di qualità, assicura una credibilità al laboratorio, che assume particolare rilievo quando vengono sollevate implicazioni legali.

Il decreto legislativo n 267 del 30 giugno 1993 definisce d'altra parte la funzione dell'Istituto Superiore di Sanità come ente di accreditamento dei laboratori di prova. Sulla base di queste considerazioni il Laboratorio Alimenti ha ritenuto utile effettuare corsi per meglio illustrare agli operatori pubblici (in particolare dirigenti di organismi di controllo presenti sul territorio nazionale) le operazioni necessarie per adeguare le proprie strutture alle caratteristiche richieste dalle norme europee.

Si è ritenuto opportuno in questa sede sviluppare alcuni aspetti contenuti nelle linee guida, riguardanti in particolare il controllo microbiologico degli alimenti, riferendo anche le modalità pratiche di attuazione delle prescrizioni. Nel fare ciò si è tenuto conto del fatto che il principio della assicurazione della qualità deve riguardare tutte le attività che si svolgono in un laboratorio, nei vari settori che vanno dal campionamento alle metodologie applicate ed ai materiali utilizzati, all'ambiente di lavoro, alle attrezzature disponibili, al personale, fino ai test di qualità intra e interlaboratorio.

Sono stati pertanto illustrati i concetti generali del programma di qualità, l'organizzazione la struttura e i requisiti del laboratorio preposto al controllo microbiologico degli alimenti, le condizioni necessarie nell'esecuzione dei saggi biotossicologici, la gestione e conservazione dei campioni, l'assicurazione della qualità dei materiali e delle apparecchiature. Inoltre sono stati illustrati i criteri microbiologici e le caratteristiche dei metodi analitici, la valutazione del rischio microbiologico la gestione dei dati e documenti.

In appendice, considerando l'importanza del contesto in cui si svolgono tutte le operazioni di qualunque attività definita *scientifica* (incluse quelle che sono oggetto del presente corso), si sono voluti, a puro scopo conoscitivo-culturale, meglio esaminare le implicazioni e i limiti dell'applicazione, in generale, del metodo scientifico. La disamina compiuta si ricollega al fatto che la definizione della scienza più soddisfacente è quella formulata attraverso il suo metodo, in quanto essa non è unita dai contenuti ma dalla propria metodologia. L'applicazione del ciclo *induzione-deduzione-verifica*, caratteristico del metodo scientifico (ciclo che prevede il costante perfezionamento di teorie sostenute a titolo sperimentale) è stata ampiamente sottoposta a critica, anche con l'ausilio di un breve excursus storico attraverso la disciplina epistemologica.

Angelo Stacchini

IL PROGRAMMA PER L'ASSICURAZIONE DI QUALITÀ: CONCETTI GENERALI

Laura Toti

Laboratorio Alimenti, Istituto Superiore di Sanità

La necessità di stabilire delle linee guida per l'assicurazione della qualità nei laboratori preposti al controllo ufficiale degli alimenti scaturisce dalla Direttiva CEE 93/99 riguardante misure supplementari in merito al controllo ufficiale dei prodotti alimentari: La direttiva prende origine da due esigenze fondamentali che si sono andate affermando a livello della comunità europea: la prima è che lo sviluppo del commercio dei prodotti alimentari tra gli Stati membri richiede una collaborazione più stretta tra le autorità sanitarie che sono incaricate del controllo mentre la seconda è costituita dal fatto che gli agenti della Commissione europea incaricati del controllo dei prodotti alimentari in collaborazione con quelli degli Stati membri assicurino l'applicazione di disposizioni legislative uniformi in materia di derrate alimentari

La direttiva prevede infatti che i laboratori degli stati membri adottino un sistema basato su norme generalmente approvate e standardizzate, impieghino, se possibile, metodi di analisi convalidati, operino secondo i criteri generali enunciati dalla norma europea EN 45001 e siano sottoposti a verifiche in base ai principi OCSE 2 e 7 che disciplinano le buone pratiche di laboratorio.

Le norme EN 45001 riportano i criteri generali per il funzionamento dei laboratori di prova: esse forniscono indicazioni per quanto riguarda la gestione e l'organizzazione di tali laboratori stabilendo che il laboratorio deve essere competente per l'esecuzione delle prove che gli sono richieste, con responsabilizzazione del personale e supervisione di una persona esperta.

Tutta la gestione ed organizzazione del laboratorio è sotto la totale responsabilità di un direttore tecnico e deve essere descritta in un apposito documento

Le norme EN 45001 forniscono anche i criteri generali per quanto riguarda l'organizzazione del personale ed i principali requisiti dei locali e delle apparecchiature. Per quanto riguarda le procedure di lavoro, viene introdotto il concetto di attuazione di un sistema di qualità interno appropriato al tipo, al livello ed al volume dell'attività di prova eseguita.

La definizione di assicurazione della qualità di un laboratorio viene data come l'insieme delle azioni pianificate e sistematiche necessarie a garantire che il laboratorio ed i dati soddisfino determinati requisiti di qualità.

Il sistema di assicurazione della qualità, SAQ, deve essere affidato ad una persona, il responsabile della qualità, possibilmente affiancata da altro personale, (unità di assicurazione della qualità - UAQ) con buona conoscenza ed esperienza nel settore, non direttamente coinvolta nelle analisi, designata dalla direzione e direttamente responsabile di fronte ad essa. Nell'ambito del laboratorio la UAQ costituisce una unità a parte dotata di ampio potere e responsabilità in grado di controllare le procedure adottate e le relative registrazioni I compiti e le attribuzioni del responsabile della qualità e della UAQ sono descritti nelle Tab. 1 e 2.

Tabella 1 - *Compiti del responsabile dell'assicurazione della qualità*

-
- √ Predisporre il sistema qualità
 - √ Concordare con il direttore del laboratorio ed i direttori di settore i tempi e le modalità di realizzazione del SAQ
 - √ Redigere il MG e le PG unitamente al direttore di laboratorio e con la collaborazione del personale del laboratorio
 - √ Assicurare che il MQ, le PG e le POS siano a disposizione del personale
 - √ Organizzare il CQ
 - √ Verificare periodicamente lo stato della qualità del laboratorio e redigere rapporti periodici sullo stato del sistema qualità
 - √ Proporre eventuali azioni correttive
 - √ Relazionare al direttore del laboratorio in caso di deviazione non autorizzata rispetto alle indicazioni del MQ, delle PG e delle POS
-

Tabella 2 - *Compiti della UAQ*

-
- √ Ispezione periodica di installazioni ed apparecchiature
 - √ Individuazione delle fasi critiche del procedimento analitico assieme al direttore dello studio
 - √ Verifica delle POS e della loro gestione
 - √ Verifica della corretta archiviazione dei dati grezzi e dei rapporti
 - √ Individuazione e notificazione alla Direzione di modifiche delle procedure
-

Il SAQ deve necessariamente essere differenziato dal cosiddetto controllo di qualità per il quale si intende l'insieme di tutte le tecniche ed attività a carattere operativo programmate dalla direzione del laboratorio, di concerto con il responsabile del SAQ, per monitorare in modo continuativo che tutte le operazioni ed i risultati ottenuti siano dotati della necessaria affidabilità.

Nei laboratori di microbiologia l'adozione di un programma per l'assicurazione della qualità sta avvenendo sicuramente in modo molto più cauto e lento di quanto avvenga in altre discipline. Quelle microbiologiche sono infatti analisi associate ad organismi viventi che quindi spesso possono fornire risultati soggetti per loro natura ad una certa variabilità, molti microbiologi considerano questo un programma burocratico che comporta perdite di tempo e comunque difficilmente applicabile alla loro tipologia di analisi.

Al contrario ci si è andati invece rendendo conto che l'adozione di un programma di assicurazione della qualità porta, alla fine, ad un risparmio di tempo e di denaro per le seguenti ragioni:

1. riduce la necessità di ripetere analisi che possono essere anche costose
2. fornisce dati ottenuti attraverso procedure che assicurano la accettabilità dei risultati
3. prevede un addestramento del personale con adozione di procedure scritte al fine di evitare errori che possono essere anche costosi
4. identifica ciò che è necessario fornire allo staff al fine di ottenere un servizio di qualità
5. assicura una credibilità al laboratorio, che assume particolare rilievo quando ci sono implicazioni legali.

Il principio della assicurazione della qualità deve riguardare tutte le attività che si svolgono in un laboratorio che possono essere schematizzate individuando i seguenti settori:

- a) campionamento,
- b) metodologia,
- c) ambiente,
- d) attrezzatura,
- e) reagenti e terreni
- f) personale
- g) materiale di riferimento
- h) test di qualità intra e interlaboratori.

Campionamento

Ai fini dell'analisi microbiologica rivestono particolare importanza

- la natura del campione
- la grandezza
- la stabilità
- le condizioni in cui si trova al momento del prelievo
- il tempo intercorso tra il prelievo e l'analisi.

E' necessario infatti tener presente che alcuni batteri possono duplicarsi nel giro di 30 minuti per cui un ritardo nell'analisi o la conservazione del campione in condizioni non adeguate possono falsare i risultati

Il principio fondamentale del campionamento è che il campione deve essere rappresentativo del lotto dal quale viene prelevato. Ciò naturalmente presuppone che il pool da cui proviene il campione sia omogeneo e stabile: come è noto i microrganismi crescono costituendo dei focolai e non sono quindi uniformemente dispersi nel substrato a meno che non si possa procedere ad una accurata omogeneizzazione. A parte l'acqua ed altre sostanze molto liquide gli alimenti in genere non possono essere facilmente resi omogenei cosicché la selezione di un campione rappresentativo è molto difficile.

Il numero di microrganismi in un campione varia continuamente ed anche il congelamento del campione a -20°C prima dell'analisi, al fine di prevenire la

proliferazione microbica, comporta la morte o lo stress per molti di essi. E' quindi necessario adottare regole di trasporto e di mantenimento del campione tali da assicurare, il più possibile, la conservazione dei microrganismi presenti. Il tutto deve essere accuratamente registrato in un'apposita documentazione.

Metodologia

La scelta di un metodo di analisi dipende, naturalmente, dal tipo di organismo che si intende ricercare e si fonda sulla scelta di terreni che sono sempre il risultato di un compromesso tra la capacità ad inibire la flora accessoria e quella di recuperare il microrganismo ricercato

Al momento attuale, in campo microbiologico esiste una grande quantità di metodi che si basano su principi diversi che vanno da quelli classici a quelli immunologici come l'ELISA fino a quelli più recenti basati sui principi della biologia molecolare come la PCR.

La scelta del metodo sarà in funzione del fine per cui l'analisi deve essere eseguita. Ad esempio, per condurre un monitoraggio dei contaminanti in uno stabilimento lattiero sarà più appropriato avvalersi di metodiche rapide che si basano sulla conduttanza e sull'impedenza, mentre il laboratorio deputato al controllo ufficiale utilizzerà il metodo culturale classico.

Qualunque sia la scelta del metodo, questo dovrà essere ben documentato e validato. Al momento attuale esistono molti metodi messi a punto da organizzazioni nazionali ed internazionali che sono già validati, per gli altri si dovrà procedere al più presto alla validazione. La validazione di un metodo microbiologico viene effettuata attraverso l'analisi di prodotti naturalmente o sperimentalmente contaminati attraverso prove collaborative tra laboratori diversi.

Ambiente

Naturalmente l'ambiente in cui viene eseguita l'analisi non deve in alcun modo influenzare il risultato. Un laboratorio ideale non dovrebbe mai avere percorsi incrociati ma ciò spesso non è possibile da ottenere specialmente quando si tratta di ambienti costruiti con vecchi criteri che è difficile riadattare. In ogni caso è necessario disporre di aree separate per quanto riguarda

- ricevimento e conservazione dei campioni
- preparazione dei campioni
- mantenimento delle colture di riferimento

Sterilizzazione e decontaminazione

I pavimenti, le pareti, i soffitti e le superfici di lavoro devono essere costruite con materiale liscio e facile da pulire e disinfettare. E' necessario procedere routinariamente ad un monitoraggio dell'ambiente mediante controlli eseguiti con piastre poste a contatto

con le superfici o esposte all'aria ambientale. Si stabilirà una conta accettabile come background ambientale stabilendo una procedura da attivare subito quando i controlli superano i limiti stabiliti. Il personale che effettua le analisi dovrà indossare idonei indumenti protettivi e toglierli quando esce dal laboratorio.

Apparecchiature

Tutte le apparecchiature utilizzate per le analisi microbiologiche devono essere mantenute in ordine e deve essere disponibile un programma per il loro mantenimento, calibrazione e verifica della affidabilità.

Apparecchiature generali quali incubatori, bagno-maria e autoclavi dovrebbero essere controllati periodicamente, mantenendo sempre una documentazione sui controlli fatti. Va inoltre messo a punto un programma apposito per la calibrazione di tutti gli strumenti ponendo una periodicità per ciascuno di essi.

I termometri del bagno-maria, ad esempio, andrebbero calibrati almeno una volta l'anno prendendo come riferimento il punto di congelamento e la temperatura alla quale normalmente lavora il b.m. Anche l'autoclave rappresenta uno strumento il cui funzionamento deve essere completamente affidabile per cui sarebbe opportuno costruirsi una di taratura con una specifica carica in modo da poter conoscere in tutti i punti la temperatura specifica per la sterilizzazione e/o decontaminazione. Ogni ciclo di lavorazione dell'autoclave deve rimanere documentato sia per quanto riguarda il tempo che la temperatura.

Reattivi

Tutti i reattivi, terreni e soluzioni utilizzati per le analisi microbiologiche devono essere preparati secondo le apposite istruzioni. I terreni preparati in laboratorio devono essere saggiati sia per quanto riguarda la loro capacità di assicurare la crescita di specifici ceppi microbici sia per quanto riguarda quella di inibire la flora accessoria.

Tutti i reagenti debbono essere usati entro il termine di validità.

Personale

Le analisi microbiologiche devono essere condotte sotto la guida di una persona qualificata in tale settore. Il personale deve essere stato sottoposto ad un addestramento adeguato sia per quanto riguarda la metodologia che per quanto riguarda la strumentazione. E' importante che vengano attuati appositi test al fine di verificare la validità del loro modo di operare.

Materiale di riferimento

Il materiale di riferimento maggiormente usato in microbiologia è costituito dai ceppi di riferimento che vengono utilizzati come controllo per fornire informazione sulle caratteristiche colturali, biochimiche e patogeniche dei ceppi in esame. Analogamente a

quello che succede per le analisi chimiche, il materiale di riferimento deve fornire determinate garanzie e predeterminate concentrazioni di microrganismi. Per produrre materiale di riferimento di questo tipo è necessario inoculare varie matrici con colture del microrganismo in esame e quantificarne il livello attraverso studi collaborativi. Tali materiali di riferimento vengono veicolati con il latte in polvere racchiuso in capsule di gelatina. Poiché, come risulta evidente, la produzione di materiale di riferimento è molto difficoltosa ed, in alcuni casi, addirittura impossibile, si possono preparare in laboratorio degli stock di colture pure, eseguirne la conta attraverso diluizioni scalari e mantenerle a -20°C per usarli come controllo nella routine.

Manuale della qualità

Le norme EN 45001 ed il DL.vo 120/92 prevedono che il SAQ venga descritto in un apposito manuale che prende il nome di Manuale della qualità alla cui stesura contribuiscono il personale del laboratorio nonché il responsabile della assicurazione della qualità che, assieme al direttore del laboratorio ne è anche il responsabile.

Il manuale della qualità deve contenere, oltre alla descrizione delle strutture fisiche ed organizzative del laboratorio, anche quella delle Procedure Generali che vengono adottate nel laboratorio stesso (Tab 3) e deve contenere la collocazione delle PG e delle POS che descrivono le attività tecniche analitiche.

Tabella. 3 - Manuale della qualità - Contenuto

√	Obiettivi del laboratorio
√	Campi di attività del laboratorio
√	Struttura organizzativa: organigramma del personale, registrazioni e mansioni
√	Ambienti e loro requisiti
√	Procedure generali di ricevimento, registrazione e conservazione dei campioni
√	Procedure generali di acquisto, codifica e conservazione dei materiali da laboratorio
√	Procedure generali di acquisto, manutenzione e taratura degli apparecchi
√	Procedure di gestione della documentazione riguardante la qualità
√	Procedure per la stesura delle PG e delle POS
√	Procedura di codifica e collocazione delle POS e delle PG
√	Procedura di messa a punto, stesura, codifica e collocazione dei metodi di analisi
√	Procedure generali di elaborazione, registrazione ed archiviazione dei dati e dei rapporti di prova finali
√	Procedure per il controllo di qualità (carte di controllo, prove intra-interlaboratorio)
√	Procedure generali delle attività di verifica ispettiva interna

Il MQ, le Procedure Generali (PG) e Procedure Operative Standard (POS); devono essere approvati dalla direzione, commentati con eventuali osservazioni da chi dovrà utilizzarli, e revisionati ogni qual volta ve ne sia la necessità. Tali documenti devono essere facilmente reperibili sul posto di lavoro ed essere a disposizione di ogni utente. Una copia aggiornata delle procedure deve essere conservata in archivio per le verifiche ispettive.

Verifica ispettiva

La verifica ispettiva viene attuata sistematicamente per determinare se le attività svolte per la qualità ed i risultati ottenuti sono in accordo con quanto pianificato e se quanto predisposto necessita di azioni correttive; essa non va confusa con il controllo di qualità che ha il solo scopo di controllare un procedimento o di accettare un prodotto. Le verifiche devono essere effettuate da personale che non ha diretta responsabilità nel settore esaminato, preferibilmente assieme al personale addetto a tale settore e possono riguardare sia il controllo di un elemento del sistema qualità come ad esempio il personale, le apparecchiature o i metodi di analisi o possono riguardare l'intero corso di una prova, dal momento della ricezione dei campioni alla registrazione ed archiviazione dei risultati relativi alla prova stessa. Le verifiche ispettive della qualità devono essere programmate con la direzione e, una volta avvenute, devono essere registrate e le registrazioni conservate. Naturalmente, in base al risultato delle verifiche, verranno intraprese delle azioni correttive per eliminare i problemi rilevati e rendere minima la probabilità che essi si ripresentino.

Una ulteriore verifica della attuazione del sistema di qualità è costituito dalla ispezione esterna che può essere effettuata dagli organi di controllo che prevede varie fasi.

Innanzitutto una conferenza di apertura nella quale viene illustrato lo schema organizzativo del laboratorio, l'organigramma del personale ed i profili professionali del personale direttivo. Vengono anche controllate le Procedure Operative Standard, il programma di addestramento del personale e le diverse tipologie di studi che vengono effettuati presso il laboratorio

Si procede quindi alla ispezione degli archivi e delle installazioni ed apparecchiature. L'ultima fase è costituita dalla ispezione delle attività e cioè degli studi già eseguiti e di quelli in corso di esecuzione.

ORGANIZZAZIONE STRUTTURA E REQUISITI DEL LABORATORIO PREPOSTO AL CONTROLLO MICROBIOLOGICO DEGLI ALIMENTI

Luciana Croci
Laboratorio Alimenti, Istituto Superiore di Sanità

Introduzione

L'obiettivo principale dell'applicazione di un programma di assicurazione della qualità in laboratorio è l'ottenimento dell'accuratezza e la precisione delle analisi, in modo tale che possa essere garantita la qualità dei risultati.

A tale scopo è indispensabile una dettagliata pianificazione della struttura organizzativa (organigramma del personale, mansioni e registrazioni), la disponibilità di idonei ambienti di lavoro nonché la disponibilità di tutte le Procedure Generali e le Procedure Operative Standard. Tutto ciò deve essere oggetto di un Manuale della Qualità, della cui stesura il Direttore di Laboratorio, in collaborazione con il Responsabile della Qualità ed i Direttori di Settore, dovrà farsi carico, che costituisce lo strumento di fondamentale importanza per razionalizzare i concetti insiti nel Programma di Assicurazione della Qualità

Personale del laboratorio

Il laboratorio deve disporre di personale qualificato e in numero sufficiente, relativamente all'attività del laboratorio stesso. Deve essere, quindi, predisposto un organigramma del personale, in cui vengono riportate le mansioni e la suddivisione dei compiti. In particolare deve essere redatto ed aggiornato un elenco degli operatori abilitati ad eseguire le prove o parti di esse.

La predisposizione di un dettagliato organigramma, completo di indicazioni sulle responsabilità e le mansioni, è importante per verificare:

- se tutte le funzioni previste sono presenti e ben definite
- le eventuali concomitanze di funzioni in una stessa persona
- la congruità del personale alle necessità di lavoro previste

Organigramma

- Direttore del laboratorio
- Direttore di settore
- Personale tecnico-laureato
- Personale tecnico
- Responsabile dell'archivio
- Personale amministrativo
- Responsabile del Programma di Assicurazione della Qualità

Formazione - Particolare attenzione deve essere rivolta all'istruzione e all'addestramento del personale. Tutti i componenti del Laboratorio al fine di migliorare la propria professionalità devono partecipare a corsi di formazione, di aggiornamento e di perfezionamento, sia interni che esterni, a convegni e seminari ed altre attività tecnico-scientifiche pertinenti. Nelle norme ISO 9004-UNI 29004 vengono riportati alcuni punti riguardanti la formazione e l'addestramento del personale, al fine di renderlo consapevole dell'importanza dell'applicazione di un programma di assicurazione della qualità:

a) tutto il personale deve essere coinvolto da programmi di "indottrinamento" da quello direttivo a quello tecnico, ai supervisori, in particolare il personale di nuova assunzione o che è stato trasferito a nuovi compiti;

b) nel caso siano necessarie particolari competenze o abilità, può essere opportuno richiedere addestramenti specifici per l'ottenimento delle relative qualifiche

c) deve essere svolta una opportuna azione affinché il personale comprenda a fondo i ruoli ed i compiti, che gli sono stati attribuiti, e perché si renda conto dei vantaggi di un lavoro svolto in maniera corretta.

Occorre, inoltre, tener presente che il personale dei laboratori di microbiologia lavora con microrganismi patogeni o potenzialmente tali, a seconda del dosaggio e delle circostanze è quindi di fondamentale importanza che vengano rispettate determinate norme, non solo per la qualità dei risultati, ma anche per la sicurezza dell'operatore. Saper evitare le infezioni è infatti elemento essenziale della professionalità di un microbiologo, poiché non esiste cappa biologica o altra attrezzatura o protocollo che possano garantire da soli la sicurezza, a meno che gli utenti non adottino tecniche sicure basate sull'informazione e la consapevolezza del rischio. Nell'esecuzione delle procedure sono richiesti quindi attenzione e controllo intelligente su ciò che si sta facendo, uniti ad una supervisione ed una sorveglianza adeguate. Anche per la sicurezza i responsabili del Laboratorio devono giocare un ruolo chiave nell'addestramento continuo del personale, fornendo materiali didattici e protocolli riguardanti pratiche e procedure di laboratorio.

Sicurezza e qualità quindi sono due concetti che non possono prescindere l'uno dall'altro, alla cui base è il possesso di una buona tecnica in grado di assicurare le migliori condizioni di asepsi, allo scopo di:

- isolare e/o numerare solo i microrganismi presenti nel campione
- non contaminare l'ambiente con i microrganismi presenti nel campione
- evitare contaminazioni crociate
- proteggere l'analista dal pericolo di infezioni

I dati di ciascun componente del laboratorio, quali curriculum aggiornato, qualifica, corsi di formazione ed altro devono essere documentati, ad esempio mediante schede personali e parte di tale documentazione deve essere riportata nel Manuale della Qualità.

Struttura e requisiti del laboratorio

Nella progettazione di un laboratorio di microbiologia occorre tener presente il lavoro che deve svolgere, con particolare riferimento ai microrganismi da manipolare. Infatti questi ultimi in base alla loro patogenicità alle modalità di trasmissione e alla disponibilità di misure preventive e di trattamenti efficaci, sono stati suddivisi in 4 categorie di rischio (Tab.1).

Tabella 1 - *Classificazione dei microrganismi in base alla valutazione del rischio*

GRUPPO	RISCHIO		PATOGENICITÀ
	INDIVIDUALE	COLLETTIVO	
1	nessuno o basso	nessuno o basso	Un microrganismo che è difficilmente causa di malattie nell'uomo o negli animali
2	moderato	limitato	Un patogeno che può causare malattie nell'uomo o negli animali pur non costituendo un serio rischio per chi lavori in laboratorio, per la comunità, per il bestiame o per l'ambiente. In caso di esposizione in laboratorio può causare serie infezioni, ma sono disponibili trattamenti efficaci e misure preventive, ed il rischio di diffusione è comunque limitato.
3	elevato	basso	Un patogeno che causa serie malattie nell'uomo o negli animali, ma che normalmente non si diffonde da un individuo infetto ad uno sano. Sono disponibili trattamenti efficaci e misure preventive.
4	elevato	elevato	Un patogeno che normalmente produce gravi malattie nell'uomo e negli animali e che può essere facilmente trasmesso da un individuo all'altro, direttamente o indirettamente. Non sono disponibili trattamenti efficaci né misure preventive.

Di conseguenza anche i Laboratori vengono definiti a seconda dei loro compiti e delle loro caratteristiche, come:

- laboratorio di base - livello di biosicurezza 1
- laboratorio di base - livello di biosicurezza 2
- laboratorio di sicurezza - livello di biosicurezza 3
- laboratorio di massima sicurezza- livello di biosicurezza 4

I laboratori di microbiologia degli alimenti rientrano nelle prime due categorie sopra citate, cioè laboratorio di base-livello di biosicurezza 1 e 2 (Tab 2), in quanto i microrganismi coinvolti rientrano per lo più nelle categorie di rischio 1 e 2 (tranne qualche eccezione come la *Salmonella typhi* e il virus dell'epatite A che rientrano nella categoria 3) (D.L.vo n.626 del 19.9.94 - G.U. n.265 del 12.11.94)

Tabella 2 - Laboratori di biosicurezza livello 1 e 2

GRUPPI DI RISCHIO	LIVELLO DI BIOSICUREZZA	OPERAZIONI DI LABORATORIO	ATTREZZATURE DI SICUREZZA
1	di base-livello di biosicurezza 1	BTM ^a	Nessuna; si lavora su normali banconi
2	di base-livello di biosicurezza 2	BTM ^a più indumenti protettivi; simbolo del rischio biologico sulla porta	Normali banconi più CSB ^b per eventuali aerosol

BTM^a, buona tecnica microbiologica
CSB^b, cappa di sicurezza biologica

Per lo svolgimento di un lavoro affidabile e sicuro è indispensabile la disponibilità di spazi sufficientemente ampi, di una corretta disposizione e manutenzione dei locali e delle attrezzature, nell'osservanza dei seguenti punti:

- suddivisione delle aree di lavorazione
- pulizia e disinfezione degli ambienti e delle attrezzature
- controllo ambientale

Ambienti

Un laboratorio microbiologico deve disporre dei seguenti locali o aree separate (Fig. 1):

1. Archivio
2. Area preparazione dei terreni di coltura
3. Area sterilizzazione terreni di coltura
4. Area esecuzione analisi:
 - a) batteriologiche,
 - b) micologiche,
 - c) virologiche
 (non devono necessariamente sussistere le tre aree)

5. Area sterilizzazione materiale infetto
6. Area smaltimento rifiuti
7. Area preparazione vetreria

Archivio - Deve essere di dimensioni e struttura adeguate e tale da garantire la conservazione dei campioni e della documentazione in condizioni di sicurezza.

La struttura dell'archivio deve essere suddivisa almeno in due locali:

- √ Locale conservazione campioni, dotato di frigoriferi, congelatori ed armadi per la opportuna conservazione in relazione alla tipologia dei prodotti e/o ai controlli analitici;
- √ Locale per archiviazione della documentazione, attrezzato per la conservazione in originale o copia certificata di tutti i protocolli, i dati grezzi, i rapporti di prova finali ed ogni altra documentazione pertinente con la conduzione delle analisi (rapporti di manutenzione, rapporti della UAQ)

L'archivio inoltre deve essere dotato di un adeguato sistema di inventario che consenta con prontezza la localizzazione del materiale e la documentazione archiviata.

L'accesso all'archivio deve essere consentito esclusivamente al personale autorizzato dal Direttore del Laboratorio.

Area preparazione terreni di coltura - E' destinata alla pesata delle polveri, alla loro idratazione e dissoluzione a caldo.

Area sterilizzazione terreni di coltura - E' destinata alla sterilizzazione in autoclave dei terreni disciolti. Tale autoclave deve essere utilizzata unicamente a questo scopo e deve poter essere programmata alle diverse condizioni di temperatura e tempo previste per ogni singolo terreno colturale.

Area esecuzione analisi - E' destinata a tutte le manipolazioni necessarie all'esecuzione delle analisi. Le attrezzature e le apparecchiature devono essere razionalmente distribuite in modo da consentire all'analista di operare agevolmente. I piani di lavoro (altezza 90-95 cm; profondità 70-75 cm; spazio/analista 180 cm) devono essere rivestiti, senza soluzione di continuità, con materiale impermeabile, liscio, anti-graffio e anti-acido, facilmente lavabile e disinfettabile. Inoltre devono essere predisposti per prese elettriche, punti di erogazione del gas e di acqua distillata e lavelli.

Inoltre devono essere previste tutte le apparecchiature necessarie per l'esecuzione delle diverse analisi, vicino ad ogni posto di lavoro deve essere sistemato un numero sufficiente di contenitori per eliminare materiale monouso e contenitori per raccogliere vetreria infetta da sterilizzare, contenenti un disinfettante adatto, preparato ogni giorno. Il materiale di scarto deve rimanere a contatto con il disinfettante per almeno 18 ore, quindi i materiali solidi vanno sistemati in un contenitore per essere autoclavati o inceneriti.

Area sterilizzazione materiale infetto - E' destinata alla sterilizzazione in autoclave sia della vetreria infetta che del materiale monouso e altri materiali da eliminare, posti in appositi sacchi di plastica autoclavabili. L'autoclave utilizzata deve essere programmata per raggiungere temperature di almeno 134°C. La vetreria che deve essere riciclata, dopo la sterilizzazione deve essere lavata per mezzo di idonee lava-vetreria predisposte per il risciacquo con acqua distillata. Deve essere presente un lavello possibilmente a due vasche con ampio piano di appoggio e presa per acqua distillata. Anche i contenitori devono essere autoclavati e lavati prima di essere riutilizzati. Tutti i materiali, quindi, devono essere decontaminati, ma alcuni devono essere poi rimossi dal laboratorio o distrutti. La decontaminazione e l'eliminazione dei rifiuti sono strettamente correlate. I materiali da eliminare devono essere posti in sacchi di plastica, racchiusi a loro volta in contenitori di cartone con un'etichetta in cui viene specificato il contenuto (secondo specifiche norme comunali) e trasportati nell'area smaltimento rifiuti

Area smaltimento rifiuti - Deve essere attigua alla zona di sterilizzazione del materiale infetto e ben isolata dagli altri ambienti ed è destinata alla raccolta dei contenitori del materiale infetto sterilizzato, in attesa di essere smaltito. Questo può essere portato direttamente all'inceneritore, quando l'Istituto ne è fornito, o viene ritirato da una Ditta autorizzata, per essere poi incenerito lontano dal Laboratorio. L'inceneritore necessita di una progettazione particolare, deve essere dotato di post-bruciatori e di apparati per l'eliminazione di fumi. Le ceneri possono essere trattate come normali rifiuti urbani e rimosse dalle autorità locali

Area preparazione vetreria - E' destinata alla sterilizzazione della vetreria in stufa a secco (180°C) o autoclave (121°C) a seconda del tipo di materiale. Deve essere attrezzata con un piano di lavoro, sufficientemente ampio e dotata di lavello con presa per acqua distillata e armadi per stoccaggio vetreria.

Caratteristiche della progettazione

Tutte le infrastrutture e gli impianti di base del laboratorio devono rispondere a quanto previsto dal D.L.vo n. 626 del 19.9.94 riguardante il miglioramento della sicurezza e della salute dei lavoratori nel luogo di lavoro.

- √ Devono essere assicurati ampi spazi per lo svolgimento sicuro del lavoro di laboratorio, delle pulizie e della manutenzione.
- √ Le pareti, il soffitto e il pavimento devono essere trattati con materiale impermeabile e liscio, facilmente pulibile e resistente agli agenti chimici e ai disinfettanti, normalmente usati in laboratorio. I pavimenti devono essere antiscivolo. Le tubature a vista devono essere ben discoste dal muro. Le superfici orizzontali vanno ridotte quanto più possibile, per evitare l'accumulo di polvere.
- √ Tutte le aree di lavoro devono essere opportunamente protette da condizioni anormali quali rumore, vibrazioni, disturbi o interferenze elettromagnetiche, nonché variazioni di temperatura, polveri, umidità, vapore. I laboratori dovrebbero essere dotati preferibilmente di un impianto centralizzato di aria condizionata, in grado di

fornire una buona ventilazione, di abbattere le polveri, di assorbire odori sgradevoli e di garantire una minima variazione di temperatura.

- √ Sono raccomandate una temperatura ambiente di 21°-23°C ed una umidità relativa del 45%-50%. In mancanza di aereazione meccanica le finestre devono essere apribili e preferibilmente dotate di reti contro gli insetti.

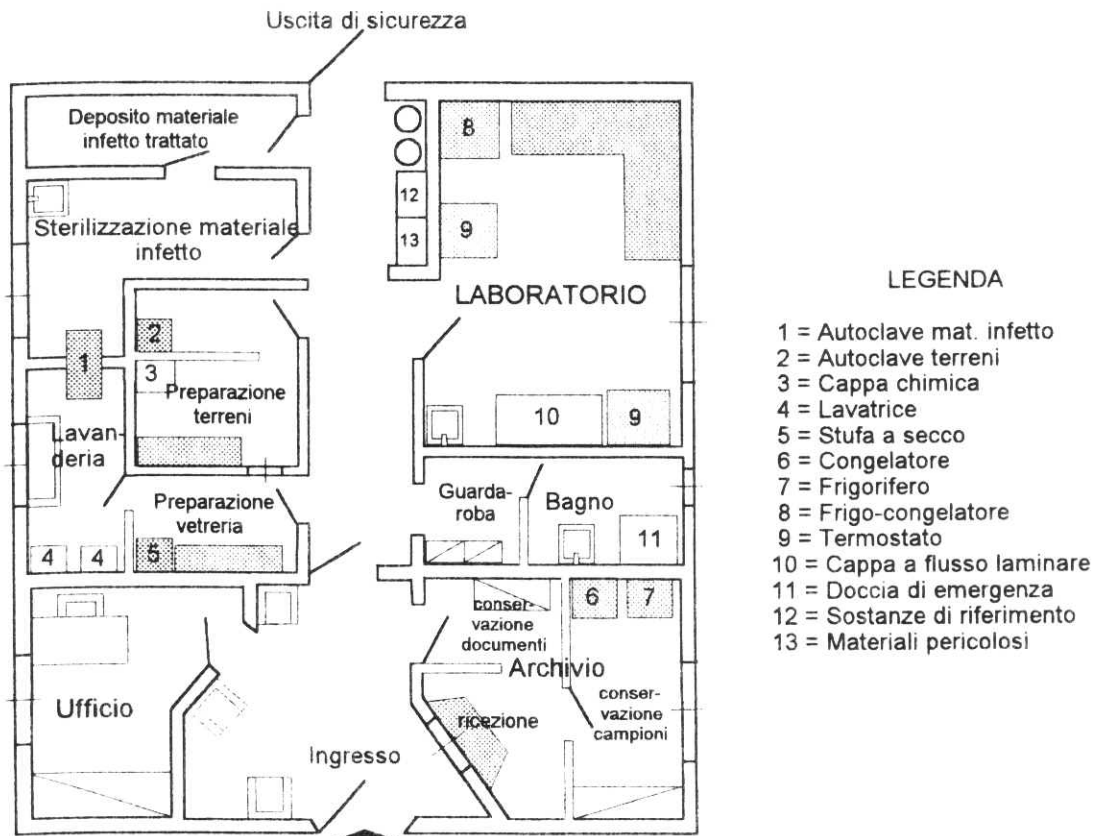


Figura 1- Schema di Laboratorio Batteriologico

- √ L'illuminazione deve essere adeguata per tutte le attività. I riflessi indesiderabili e le luci troppo forti vanno evitati. Sarebbe opportuno quindi far ricorso alla luce artificiale mantenuta ad una intensità di 50-100 watts.
- √ I mobili del laboratorio devono essere robusti. Gli spazi aperti fra e sotto i banconi, gli armadi e le attrezzature devono essere accessibili per la pulizia.
- √ Devono esserci spazi adeguati per riporre materiali di uso frequente, onde prevenire un eccessivo disordine sui banconi. Vanno assicurati altri spazi destinati alla conservazione a lungo termine, convenientemente situati al di fuori delle aree di lavoro.

- √ Devono essere assicurati adeguati spazi e strutture per utilizzare e conservare in modo sicuro solventi, materiali radioattivi e gas compressi e liquidi.
- √ In ogni stanza del laboratorio vanno situati lavabi dotati di acqua corrente, preferibilmente vicino alla porta.
- √ Fuori delle aree di lavoro devono essere disponibili strutture guardaroba per riporre cappotti e oggetti personali.
- √ I sistemi di sicurezza devono comprendere uscite di sicurezza, un sistema antincendio, un impianto elettrico di emergenza, docce di emergenza e dotazioni per il lavaggio degli occhi.
- √ Servizi igienici in numero adeguato

Inoltre:

- √ Deve essere predisposto un piano contro gli insetti e i roditori.
- √ L'ingresso di persone esterne al laboratorio deve essere regolamentato.
- √ Si deve evitare il trasporto di attrezzature da una stanza all'altra.
- √ Si deve evitare di fumare e mangiare in laboratorio.

Programma di pulizia e sanificazione di ambienti di lavoro ed attrezzature

La pulizia degli ambienti di lavoro deve essere eseguita o da personale del laboratorio o da impresa secondo il seguente piano:

- | | |
|-------------------|---|
| giornalmente: | lavaggio pavimenti di tutte le aree di lavorazione
sostituzione sacchi rifiuti
sanificazione servizi igienici
disinfezione di tutte le superfici di lavoro
disinfezione di superfici e vetri delle cappe a flusso laminare
disinfezione piatti bilance |
| -settimanalmente: | disinfezione cappe con disinfettante spray |
| -mensilmente: | lavaggio pareti di tutte le aree di lavorazione
lavaggio vetri porte
disinfezione superfici termostati
disinfezione superfici frigoriferi |
| -semestralmente: | trattamento termostati con disinfettanti spray
disinfezione congelatori
disinfestazione e derattizzazione dei locali, eseguita da personale specializzato |

La disinfezione delle attrezzature deve essere eseguita da personale del laboratorio, avendo cura di cambiare ciclicamente il disinfettante onde evitare l'instaurarsi di microrganismi resistenti.

Esiste una considerevole diversità nella formulazione dei disinfettanti in commercio, è perciò essenziale che vengano seguite le diluizioni raccomandate dal fabbricante. La maggior parte dei disinfettanti ha effetti tossici, quindi si dovrebbero usare guanti grembiuli e protezione per gli occhi quando vengono diluiti per l'uso.

Il controllo ambientale

Le operazioni per il controllo degli ambienti devono essere eseguite dal personale del laboratorio, secondo il seguente schema:

- settimanalmente: determinazione della contaminazione totale delle superfici di lavoro
determinazione della contaminazione totale delle superfici delle cappe a flusso laminare
- mensilmente: determinazione della contaminazione dell'aria di tutti gli ambienti di lavorazione
determinazione della contaminazione dell'aria filtrata dalle cappe a flusso laminare
- semestralmente: determinazione della contaminazione totale dei frigoriferi e di termostati

Nei casi di non conformità si procede alla verifica delle cause e si sospendono, cautelativamente, l'utilizzazione degli strumenti e/o le manipolazioni fino a rimozione dello stato di contaminazione.

Determinazione della contaminazione microbica delle superfici

Tra i vari metodi proposti vengono riportati i seguenti:

- a) Un metodo pratico è basato sull'impiego di tamponcini sterili inerti da sottoporre, dopo il contatto, ad eluizione. Al momento dell'uso i tamponcini devono essere inumiditi con soluzione fisiologica e passati su un'area della superficie (10 cm² e più) delimitata da uno schermo metallico forato e previamente sterilizzato. È preferibile utilizzare tamponcini di alginato di calcio (o simili), che si dissolvono totalmente in soluzioni contenenti lo 0,1% di fosfato trisodico dodecaidrato (occorre bilanciare il pH intorno a 7; formula suggerita: NaCl g 4- MgCl₂ g 0,1 - Na₃PO₄ · 12 H₂O g 1 - KH₂PO₄ g 0,8 - Na₂S₂O₃ · 5 H₂O g 0,5 - Tween 80 ml 0,1- H₂O dist. ml 1000), cedendo il loro contenuto microbico. La soluzione quindi potrà essere utilizzata per le diverse determinazioni, mediante i relativi terreni di coltura. I risultati saranno espressi per cm² di superficie (utilizzando schermi di 10 cm² e 10 ml di soluzione diluente- dissolvente si avrà 1 ml corrispondente ad 1 cm²).
Valore guida di idoneità delle superfici di lavoro con il metodo delle diluizioni: 10-100 germi/cm².
- b) Un secondo metodo è quello per impronta ed incubazione diretta, che utilizza piastrine tipo RODAC (diametro = 6 cm), contenenti diversi terreni agarizzati (16 ml), è buona norma aggiungere il terreno con sostanze, quali lecitina (0,1 - 1%),

Tween 80 (0,01 - 0,1%), sodio tiosolfato (0,05%) ecc., che neutralizzano eventuali residui di disinfettanti, per evitare che questi inibiscano i germi durante l'incubazione. Le piastrine si appoggiano capovolte sulla superficie da campionare, esercitando una lieve pressione per circa 20"-30". Valore guida di idoneità delle superfici di lavoro : non più di 2 u.f.c./cm² (circa 50 colonie/piastrina), come carica batterica totale su TSA a 32°C per 48 h. (Orefice 1993).

Determinazione della carica batterica dell'aria

Anche per la determinazione della contaminazione microbica dell'aria si conoscono diversi metodi, tra cui:

- a) Metodo dell'esposizione diretta di piastre contenenti terreno agarizzato, basato sia sull'effetto della gravità (modesto su particelle < 10 µm) che su effetti inerziali (dovuti alla velocità e turbolenza dell'aria). Tale metodo non consente di risalire al numero di microrganismi presenti in un volume unitario di aria, in via del tutto indicativa si può ritenere che il rapporto tra ufc/m³ e ufc/dm²/ora oscilla in linea di massima tra 3 e 12. Il metodo, pur nella variabilità dei risultati, fornisce dati sulla effettiva sedimentazione microbica nelle zone direttamente esplorate.
- b) Determinazioni effettuate mediante apparecchi aspiratori, ad esempio di tipo SAS, che aspirano volumi prefissati di aria, convogliandoli su piastre contenenti terreni agarizzati. Le piastre vengono poi rimosse e poste ad incubare.
Valore guida per ambienti paucimicrobici : < 500 ufc/m³ (L.Orefice, 1993).

Documentazione

Documentazione da inserire nel Manuale della Qualità

Personale:

- √ Organigramma del personale
- √ Per ciascuna qualifica descrizione dei requisiti richiesti e delle mansioni previste
- √ Elenco del personale con indicazione della collocazione delle relative schede di registrazione

Laboratorio:

- √ Scheda di identificazione del laboratorio e dei diversi settori
- √ Planimetria del laboratorio con l'identificazione delle diverse attività
- √ Elenco codificato delle procedure per la tutela della salute e per la sicurezza dei lavoratori
- √ Elenco codificato delle procedure di sanificazione e controllo ambientale

Documentazione, da tenere in laboratorio, necessaria per l'attuazione del Programma di Assicurazione della Qualità

Personale

- Schede di registrazione del personale, contenenti dati anagrafici, titolo di studio, formazione ed esperienza settore di appartenenza, qualifica ed attività svolta e curriculum studiorum aggiornato.

Laboratorio

- Programma e procedure di sanificazione con specifica degli interventi e della loro frequenza
- Procedure per il controllo ambientali
- Registrazione degli interventi effettuati
- Procedure per la tutela della salute e per la sicurezza dei lavoratori

BIBLIOGRAFIA

Coni E., Croci L., Draisci R., Gianfranceschi M., Pasolini B., Sanzini E. e Stacchini A. 1996. Linee guida per l'assicurazione della qualità nei laboratori preposti al controllo ufficiale dei prodotti alimentari. *Rapporti ISTISAN 96/1*.

Manuale di biosicurezza in laboratorio. Seconda edizione. Pubblicata per conto della World Health Organization, a cura di G. Orefici. 1995. *Ann. Ist. Sup. Sanità* suppl. al n.2 vol 31.

Orefice L. 1993. L'igiene della produzione e della conservazione degli alimenti con particolare riguardo al settore delle carni. *Rapporti ISTISAN 93/14*