

CONDIZIONI AMBIENTALI E MISURE DA ADOTTARE PER UNA CORRETTA ESECUZIONE DEI SAGGI BIOTOSSICOLOGICI.

Lucia Fenicia

Laboratorio Alimenti - Istituto Superiore di Sanità

Introduzione

Nell'ambito del controllo degli alimenti, i saggi biotossicologici che utilizzano animali da laboratorio vengono effettuati per valutare la presenza di sostanze tossiche, sia di natura biologica che chimica o il potere patogeno di alcuni microrganismi.

Il ricorso a tali metodiche è sempre stato limitato a quei casi in cui non vi erano metodi diversi altrettanto specifici o sensibili: la tendenza, però, ad evitare l'utilizzazione degli animali è sempre stato uno degli obiettivi della ricerca scientifica in questo specifico campo, e questo accanto a motivazioni di natura etica, economica, organizzativa anche per motivi più specificamente scientifici. Infatti, se il modello animale è in alcuni casi insostituibile per sensibilità ed affidabilità, è soggetto d'altra parte ad una variabilità che lo rende difficilmente standardizzabile e che può influire sulla valutazione del saggio stesso.

Negli ultimi anni, infatti, alcuni saggi che prevedevano l'uso degli animali, sono stati sostituiti con tecniche diverse che utilizzano soprattutto le colture cellulari, saggi immunoenzimatici o, ancora più recentemente con tecniche di biologia molecolare; in altri casi invece non si sono trovate ancora alternative idonee.

Questa tendenza si è concretizzata nel 1986, anche sotto la spinta dei movimenti ambientalisti europei, nell'emanazione di una Direttiva della Comunità sul "Ravvicinamento delle normative degli Stati membri relative alla protezione degli animali a fini sperimentali o ad altri fini scientifici", recepita nel nostro Paese con il Decreto legislativo 116 del 1992.

I saggi biotossicologici sugli alimenti devono pertanto essere effettuati attualmente nel rispetto di quanto previsto da tale normativa che ha riconosciuto ed individuato il concetto di "benessere animale" che, nell'ambito della sperimentazione viene inteso come "assenza di stress, dolore, angoscia e sofferenza".

Ovviamente però se il fine è più strettamente etico, oggetto della normativa è l'attività sperimentale nel suo insieme di procedure, che vanno dall'allevamento, al mantenimento dell'animale, alla sperimentazione in senso stretto.

Lavorare nel rispetto di norme ben precise nella organizzazione e nella gestione di tutto il sistema, ha come fondamentale scopo quello di :

- ridurre gli esperimenti
- ridurre il numero di animali utilizzati
- ridurre al massimo la sofferenza

D'altra parte, però arrivare a standardizzare alcuni aspetti delle procedure, porta ad un miglioramento sia dell'efficacia che dell'efficienza degli esperimenti.

Al momento attuale l'utilizzazione degli animali nell'ambito del controllo degli alimenti, è limitato a quei casi in cui una normativa ufficiale lo prevede o non vi sono altri test altrettanto specifici e sensibili. (Tab.1)

Tabella 1 - Schema dei saggi biotossicologici utilizzati nell'analisi degli alimenti

TIPO DI DETERMINAZIONI	ANIMALI UTILIZZATI	VIA DI SOMMINISTRAZIONE	RIFERIMENTO
<i>Tossine batteriche</i>			
Tossine botuliniche	Topi albini razza Swiss 18-20 g	Inoculazione i.p.	Protocollo CDC Atlanta- Rapporto ISTISAN 96/35
<i>Biotossine algali</i>			
Diarrhetic Shellfish Poison (DSP)	Topi albini razza Swiss 18-20 g	Inoculazione i.p.	D.M. 31/07/95
Paralytic Shellfish Poison (PSP)	Topi albini razza Swiss 19-21 g	Inoculazione i.p.	D.M. 31/07/95
<i>Infezioni batteriche</i>			
Listeria monocytogenes	Topi albini razza Swiss 16-18 g	Inoculazione i.p.	O.M. 07/12/93
<i>Tossicità acuta</i>			
Sostanze tossiche sconosciute	Topi Ratti	Gavaggio o alimentazione normale	Rapporto ISTISAN 90/2

Il Decreto legislativo 116 del 1992 ha modificato sostanzialmente le norme dell'utilizzazione degli animali nella sperimentazione introducendo, quale novità fondamentale il principio dell'autocontrollo che responsabilizza la figura del ricercatore al rispetto di precisi requisiti, limiti e condizioni stabiliti nelle varie fasi di utilizzazione degli animali. Al di fuori di tali limiti e condizioni, con alcune deroghe ben precisate dallo stesso Decreto, si configura l'illecito penale.

I punti fondamentali ed innovativi della attuale normativa si possono così sintetizzare:

- Si è identificato nel Ministero della Sanità l'autorità responsabile del controllo di tutti gli esperimenti.
- Gli esperimenti possono essere svolti solo presso stabilimenti autorizzati dal Ministero della sanità e sotto la diretta responsabilità del ricercatore.
- si sono definiti i campi di utilizzazione degli animali negli esperimenti, ed in particolare nell'art.3 comma 1 si legge che tale uso è consentito tra gli altri fini, "...allo sviluppo, la produzione e le prove di qualità, di efficacia e di innocuità dei preparati farmaceutici, degli alimenti e di quelle sostanze....."
- Sono stati individuati tre tipi di stabilimento:
 - √ di allevamento
 - √ fornitore
 - √ utilizzatore

per ognuno dei quali sono previsti adempimenti specifici.

- * Gli esperimenti secondo la tipologia sono soggetti ad adempimenti diversi dalla semplice comunicazione alla USL competente territorialmente salvo che dette prove non comportino i casi soggetti ad autorizzazione in deroga (senza anestesia).
- * La comunicazione deve identificare il responsabile dell'esperimento (richiesta la Laurea in Medicina e chirurgia, Medicina Veterinaria, Scienze Biologiche, Scienze Naturali) e la sede dello stabilimento.
- * Il responsabile dello stabilimento si avvale di tecnici in numero adeguato addetti alla cura ed al trattamento degli animali, alla pulizia e sanificazione degli ambienti e tecnici addetti alla manutenzione degli impianti. Il responsabile promuove e consente l'aggiornamento e la formazione professionale del personale.
- * Ogni attività sperimentale deve :
 - √ Dimostrare il perché della scelta di quel particolare metodo e di quella specie animale.
 - √ Evitare sprechi, ripetizioni e sofferenze.
 - √ Operare con strumenti ed in strutture adeguati alle procedure scelte.
- * Autocontrollo da parte sia del ricercatore che degli operatori di diverso livello che fanno capo al Responsabile di Stabilimento, di riconosciuta esperienza di animali
- * Controllo sanitario permanente di un medico veterinario (dipendente dello Stabilimento o libero professionista).
- * Tendenza da parte del Ministero della Sanità tramite l'Istituto Superiore di Sanità, ad adottare come metodi ufficiali quelli che comportano l'impiego di un sempre minor numero di animali e metodi alternativi. Per metodi alternativi si intendono quei metodi che sostituiscono l'uso degli animali, che riducono il numero di animali necessari per un particolare test o che migliorano una tecnica già esistente così da ridurre al minimo il livello di stress indotto negli animali .

Condizioni ambientali e strutturali

Le condizioni ambientali e strutturali sono un elemento fondamentale per garantire il buon funzionamento del "sistema" ed identificano nella sicurezza e salute degli addetti da una parte ed in quella degli animali da esperimento dall'altra gli obiettivi fondamentali.

Le condizioni di mantenimento degli animali, sono inoltre strettamente correlate al buon risultato dell'esperimento consentendo così un minor consumo di animali eliminando inutili ripetizioni.

Le caratteristiche strettamente strutturali e le condizioni ambientali compresi i loro controlli sono descritte in un allegato al già citato D.L.vo 116.

Tali indicazioni non hanno carattere di obbligatorietà e non sono vincolanti a differenza delle disposizioni degli articoli di legge. Sono piuttosto raccomandazioni intese come linee guida in materia di prassi e di norme di Laboratorio.

Tali condizioni vanno scrupolosamente osservate dall'arrivo dell'animale nello stabilimento utilizzatore fino alla sua eliminazione.

Struttura

Per quanto riguarda la struttura vera e propria le linee guida in questo senso suggeriscono che l'ambiente in cui vengono mantenuti gli animali sia durante il periodo di acclimatazione che di esecuzione delle prove debba essere strutturato in modo da non consentire passaggi incrociati tra animali sani ed animali trattati e debba comprendere almeno due aree ben distinte:

- * Area di permanenza degli animali
- * Area di servizio

Per una corretta utilizzazione delle aree funzionali è necessario progettare zone separate e percorsi che devono procedere dalle aree pulite a quelle sporche e non viceversa, sia per quanto riguarda il personale che i materiali e gli animali.

Al fine del controllo delle possibili patologie contagiose causate da patogeni presenti nell'aria è consigliabile installare nelle varie zone un sistema a pressione relativa dell'aria in modo da ottenere una più elevata pressione positiva nelle aree più pulite e la minima negativa nelle aree più sporche. In particolare i locali di lavaggio e quelli in cui sono alloggiati animali infettati devono essere a pressione negativa rispetto alle aree pulite. Per evitare passaggi da zone sporche a zone pulite bisogna organizzare quindi un cosiddetto corridoio pulito-sporco (Fig 1)

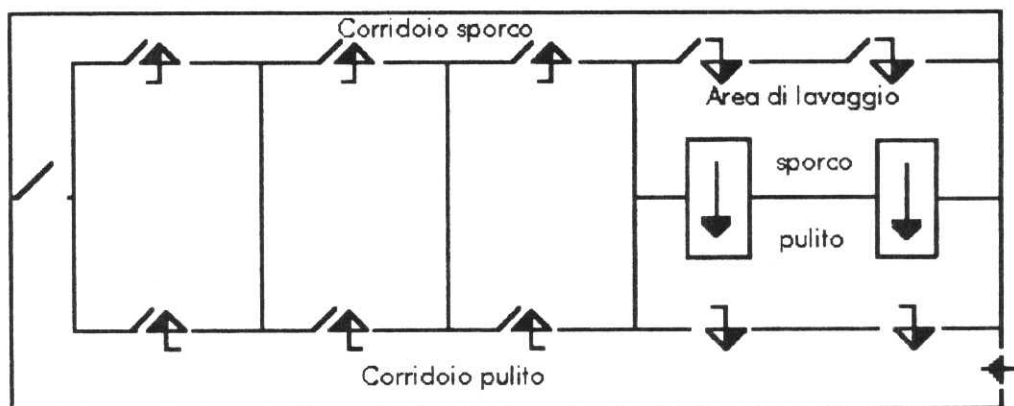


Figura 1 - Schema della planimetria di uno stabulario

Area di permanenza degli animali - Tale area deve essere suddivisa nelle seguenti zone:

- a) Zona di stabulazione degli animali (pulita)
- b) Zona di trattamento degli animali (sporca)
- c) Zona di osservazione degli animali

Le zone b) e c) possono essere nello stesso locale se sufficientemente spazioso e le manipolazioni non richiedono asepsi.

La zona di stabulazione conterrà gabbie Più grandi in cui possono essere posti più animali (per topi in genere 10-15) ma sempre omogenei tra loro (stesso lotto).

Il locale può contenere a seconda delle esigenze armadi termostatici per animali (neonati, immunodepressi) che richiedono temperature particolari.

La zona di trattamento degli animali avrà spazio sufficiente perché due operatori possano lavorare insieme senza intralci e sarà attrezzata con piani di lavoro in acciaio facilmente pulibili su cui posare il materiale necessario per lavorare nonché armadi in cui conservare l'occorrente. (bilancia ecc.)

La zona di osservazione sarà attrezzata con castelli contenenti gabbie più piccole adeguate a contenere gli animali suddivisi per ogni saggio (3-5 animali/gabbia).

Sarebbe necessario un locale separato dove poter effettuare l'autopsia degli animali.

Requisiti e monitoraggio degli ambienti di permanenza degli animali - Occorre considerare che il mantenimento di condizioni ottimali è fondamentale oltre che per il benessere dell'animale anche per garantire un loro ottimale standardizzazione.

Inoltre, un ambiente costante per tutto l'anno, permette un'attività sperimentale regolare riducendo il rischio di variabili indesiderate sul risultato sperimentale stesso.

In Tab 2 vengono indicati i requisiti riportati dal D.L.vo 116 ed alcuni sistemi di monitoraggio ambientale

Tabella 2 - Requisiti e monitoraggio degli ambienti di permanenza degli animali

Parametro da monitorare	Requisiti	Metodo di monitoraggio	Frequenza del controllo	Azioni correttive
<i>Ventilazione</i>	15-20 ricambi aria/ora di cui 8-10 a perdita totale	Flussometro o Manometro	Quotidiana	<ul style="list-style-type: none"> • Verificare la precisione della misurazione, il blocco del flusso. • Controllare i filtri dell'aria
<i>Temperatura</i>	cavie 20-24 °C neonati > 21°C	Registratore settimanale	Quotidiana	<ul style="list-style-type: none"> • Verificare la precisione del registratore. • Correggere la regolazione del termostato
<i>Umidità</i>	Umidità relativa 55% non <40% non >70%	Registratore settimanale	Quotidiana	<ul style="list-style-type: none"> • Verificare la precisione del registratore. • Correggere la regolazione del termostato
<i>Illuminazione</i>	350 - 400 lux cicli luce - buio di 12 ore	Misuratore intensità luminosa	Variabile	<ul style="list-style-type: none"> • Controllare che tutte le lampade e il regolatore di corrente siano funzionanti. • Controllare timers per corretti cicli luce/buio. • Verificare che gli interruttori manuali non annullino il timer
<i>Rumore</i>	Isolamento da rumori intensi (comportamento fisiologia)	Misuratore di rumorosità	Variabile	<ul style="list-style-type: none"> • Verificare l'intensità rumori sistemi di allarme, telefoni, sistema di condizionamento

Per quanto riguarda le caratteristiche strettamente strutturali degli ambienti, queste vengono illustrate nella Tab. 3

Tabella 3 *Caratteristiche strutturali degli ambienti e delle attrezzature dell'area di permanenza degli animali.*

	Caratteristiche strutturali	Interventi	Frequenza	Punti critici
SOFFITTI E PARETI	Superficie liscia - materiale resistente - impermeabile - facilmente lavabile	Pareti lavate e disinfettate	Quotidiana	Giunture, porte, tubature cavi, angoli arrotondati
PAVIMENTO	Liscio, impermeabile, facile da lavare	Lavato e disinfettati	Quotidiana	Drenaggi scolo coperti per impedire penetrazione di animali
PORTE E FINESTRE		Lavate e disinfettate	Variabile	Griglia per impedire accesso di animali
GABBIE	Materiale non nocivo, facile da pulire	Lavate e disinfettate	Dopo l'uso	
BOTTIGLIE	Materiale trasparente, facili da smontare	Lavate e disinfettate	Dopo l'uso	Non devono perdere acqua
ABBEVERATOI AUTOMATICI		Interventi adeguati, controllati nel funzionamento		
SUPERFICI DEI PIANI DI LAVORO	Acciaio	Pulite e disinfettate	Dopo l'uso	

Area di servizio - Accanto ma ben distinta dall'area di mantenimento degli animali sarà sistemata un'area di servizio, suddivisa in zone diverse. Il controllo delle condizioni igieniche di tale area presenta a volte maggiori problemi in quanto concentrandosi qui la parte sporca di tutto il sistema ne può diventare il punto debole.

La zona di servizio sarà quindi suddivisa in zone diverse:

***Zona lavaggio materiali**

I locali devono essere sufficientemente spaziosi per contenere attrezzature per il lavaggio e la disinfezione delle gabbie (macchine lavagabbie) e di autoclavi adibite alla sterilizzazione di materiale pulito e a quella del materiale infetto prima dello smaltimento.

Le operazioni di pulizia devono essere organizzate in modo tale da separare l'afflusso del materiale sporco da quello pulito per non infettare attrezzi appena lavati.

I muri ed i pavimenti devono essere rivestiti in materiale resistente e l'impianto di ventilazione deve garantire l'eliminazione del calore e dall'umidità eccessivi

***Zona deposito**

In appositi locali saranno sistemate gabbie vuote, strumenti, attrezzi puliti e disinfettati.

Gli alimenti dovrebbero essere conservati in locali a bassa temperatura, asciutti ed inaccessibili a vermi ed insetti; i sacchi di segatura pulita conservati in locali asciutti ed inaccessibili a vermi ed insetti.

***Zona raccolta carcasse e scarti animali:**

Se non vi è la possibilità dell'incenerimento sul posto, occorrerà prendere adeguate precauzioni per eliminare le carcasse e gli scarti animali conformemente alle norme locali.

I rifiuti di uno stabulario sono assimilati ai rifiuti speciali ospedalieri e richiedono un trattamento particolare in conformità al DPR 915/92. in materia di rifiuti speciali.

Gli interventi di pulizia per tale zona vengono indicati nella Tab 4

Tabella 4 - Interventi di pulizia previsti per l'area di servizio

Pavimenti	lavati e disinfettati	quotidianamente
Pareti, porte	lavati e disinfettati	settimanalmente
Frigoriferi congelatori	lavati e disinfettati	mensilmente

Sempre in tema di struttura è bene prevedere l'esistenza di un locale non occupato da animali, onde poter fare una rotazione degli stessi durante le operazioni di disinfezione dei locali occupati.

Sistemi di allarme- Una struttura che ospita numerosi animali è vulnerabile. Sono necessari, quindi, sistemi di allarme che segnali gli incendi e l'intrusione di persone non autorizzate. Sarebbe inoltre opportuno installare adeguati dispositivi di controllo nell'impianto di riscaldamento e di ventilazione, affinché il personale possa sorvegliarne il funzionamento globale. Sarebbe anche necessario installare un gruppo elettrogeno di soccorso in caso di guasto o di interruzione della fornitura di elettricità. Tale impianto di allarme deve d'altra parte disturbare il meno possibile gli animali.

Controlli - Nel controllo ambientale dell'area di permanenza degli animali, con particolare riferimento ai roditori, è di fondamentale importanza fare un'analisi dei punti critici e stabilire per ognuno di essi il sistema di controllo.

Bisogna tener presente che i microrganismi presenti nello spazio confinato di uno stabulario, provengono, in presenza di un efficiente sistema di filtrazione dell'aria condizionata, dagli animali, dal personale e da il materiale che viene introdotto

dall'esterno. Gli animali ne sono poi la fonte primaria e questa varia a seconda della taglia degli animali, il numero degli stessi per gabbia, dalla disposizione del gabbie ecc.

Naturalmente la diffusione dei microrganismi nell'aria confinata dello stabulario non è uniforme e presenta spesso ampie fluttuazioni di valori dovuta soprattutto a numerose variabili ambientali come temperatura umidità, pressione, carica elettrostatica numero e movimenti delle persone presenti, numero e disposizione di porte, finestre e griglie di condizionamento, tipo di pavimento, pareti, soffitto e banchi da lavoro.

Controllare le condizioni igieniche idonee in tale tipo di ambiente è sempre impegnativo e richiede la messa in opera di diversi accorgimenti per limitare le contaminazioni e la conoscenza dei numerosi punti critici da controllare.

Ad esempio gli animali andrebbero suddivisi per specie diverse in ambienti diversi ed è fondamentale attenersi ad un sistema di flusso di traffico a senso unico per aumentare l'isolamento tra operazioni e zone sporche e quelle pulite

In ogni caso, benché le problematiche riguardanti la contaminazione biologica dell'aria siano oggetto di numerosi studi, poche sono le informazioni sui rischi sulla salute derivanti dall'esposizione continuata ai biocontaminanti aerei da parte degli individui nonché sugli effetti a breve e a lungo termine.

Ai fini della salvaguardia del personale e degli stessi animali, sarebbe opportuno istituire periodicamente screening di controllo microbiologico, con un monitoraggio dell'aria confinata, delle superfici, delle mani degli operatori, delle attrezzature mobili, per avere sempre a disposizione degli elementi di giudizio sull'efficacia del sistema di disinfezione adottato.

Condizioni per il mantenimento degli animali ed alcune precauzioni nel corso dell'esecuzione dei saggi

Le condizioni di mantenimento degli animali vanno controllate all'arrivo di questi allo stabilimento utilizzatore, assicurate durante la vita dell'animale fino alla sua eliminazione alla fine del saggio.

Arrivo degli animali allo stabilimento utilizzatore - Occorre innanzi tutti rivolgersi a stabilimenti di allevamento o fornitori che siano Ditte specializzate che garantiscano la purezza della specie e le condizioni di salute oltre ad altre caratteristiche quali il sesso, il peso, l'età.

È fondamentale per la riproducibilità del risultato di un test biotossicologico l'omogeneità degli animali oltre naturalmente lo stato di salute di questi.

Vanno quindi effettuati controlli sanitari all'origine e un'ispezione all'arrivo.

Vanno controllate le condizioni e la rispondenza dei contenitori (solitamente di cartone con griglie metalliche)

Una volta arrivati gli animali vengono trasferiti in gabbie pulite e adeguatamente nutriti e dissetati. Tutti gli animali vengono registrati secondo le disposizioni del D.L.vo 116 (art.12) Il responsabile dello stabilimento deve tenere un registro in cui tra l'altro sono indicati le specie ed il numero di tutti gli animali acquistati, la provenienza, la data, il contrassegno di identificazione che corrisponde al numero di lotto, e tutti i movimenti fino all'eliminazione di ciascun animale per poter seguire il destino di ogni singolo animale o lotto di animali.

Tali registri sono preventivamente vidimati dal Ministero della Sanità e tenuti per almeno tre anni.

I contenitori utilizzati per il trasporto degli animali devono essere rapidamente distutti.

Durante la stabulazione gli animali devono godere di libertà di movimento per cui le gabbie devono avere grandezza sufficiente che naturalmente varia a seconda della specie animale e del numero di animali. Vengono indicate le misure minime previste per la superficie delle gabbie secondo le specie animali diverse:

superficie minima per il topo=180 cm² di base e 12 cm di altezza
 ratto=350 cm² di base e 14 cm di altezza

L'alimentazione sarà adeguata alla specie animale. È consigliabile alloggiare gli animali in locali differenti a seconda della specie e dell'esperimento.

L'acqua potabile deve essere somministrata in permanenza mediante bottiglie traslucide con collo largo che non consentano fuoriuscita di liquido, smontabili in tutte le loro parti e facili da lavare e sterilizzare, o mediante un sistema automatizzato (utilizzato soprattutto per le cavie).

Prima di essere utilizzati per il saggio biologico gli animali devono sempre essere sottoposti ad un periodo di acclimatazione che può variare soprattutto in base alla durata del viaggio ma non dovrebbe essere inferiore a 3 giorni. La quarantena vera e propria ha una durata di 5-15 giorni.

Una volta stabilite le condizioni ambientali e strutturali che sono il presupposto per la corretta organizzazione delle prove biotossicologiche, occorre valutare i punti critici nell'esecuzione di tali prove che possono influire sul risultato, nonché sulla sicurezza del personale

Alcune modalità e precauzioni durante l'esecuzione dei saggi

Preparazione delle dosi da somministrare

- Va effettuata una corretta standardizzazione della preparazione dell'inoculo, individuando i punti critici di tale preparazione.
- Sostanze irritanti possono provocare sintomatologia aspecifica o morte per peritonite da irritazione.

Controllo degli animali

- Prima dell'esecuzione del saggio va controllato lo stato di salute degli animali.
- Utilizzare per ogni saggio animali omogenei, appartenenti allo stesso lotto.
- È fondamentale il controllo del peso, soprattutto per alcuni saggi.

Inoculazione o trattamento

- * Utilizzare materiale monouso per evitare infezioni aspecifiche

* Inoculazione intraperitoneale: evitare di inoculare in vescica e nell'intestino che porterebbe alla perdita del materiale da saggio per eliminazione, o direttamente nei vasi sanguigni per evitare reazioni anafilattiche.

* Gavaggio: la rottura accidentale dell'esofago e l'introduzione di materiale nei polmoni può causare morte per soffocamento o polmoniti aspecifiche.

* Esternamente alla gabbia deve essere esposta chiaramente un'etichetta con il nome del ricercatore responsabile ed il suo recapito telefonico, la data dell'inoculazione, il trattamento, il numero di animali suddivisi per colore, la data della fine dell'osservazione.

Naturalmente durante il trattamento l'operatore userà accortezze per evitare qualunque rischio di contaminazione da manovre errate o incidenti:

- * Utilizzare sempre guanti monouso.
- * Controllare sempre l'inserimento dell'ago nella siringa. Occhiali e mascherine possono proteggere nel caso di distacco dell'ago durante l'inoculazione e conseguente fuoriuscita del liquido.
- * Durante l'inoculazione muoversi con cautela per evitare qualunque rischio all'operatore che maneggia l'animale.
- * Non reinserire l'ago nel cappuccio mantenendo questo in mano: utilizzare i sistemi di sicurezza progettati per tale scopo.
- * Le siringhe utilizzate vanno poste negli appositi secchielli rigidi di sicurezza e quindi sterilizzate.

Osservazione degli animali:

- * Va effettuata da personale specializzato, meglio se dallo stesso operatore che ha effettuato il trattamento.
- * Porre attenzione alla turnazione soprattutto nei giorni festivi.
- * Le osservazioni nel caso di sostanze tossiche vanno fatte subito dopo e qualche tempo dopo il trattamento.
- * Effettuare le osservazioni direttamente nelle gabbie (cage side observation).
- * Si prosegue l'osservazione gabbia per gabbia da sinistra verso destra e dall'alto verso il basso.
- * Se si evidenzia una alterazione sospetta, si preleva l'animale dalla gabbia.
- * L'autopsia degli animali alla fine del saggio può dare indicazioni utili in caso di risultati dubbi rivelando infezioni aspecifiche o errori di somministrazione.
- * Al termine del saggio gli animali saranno eliminati con metodi umanitari.

I protocolli prevedono per i roditori adulti metodi fisici come la dislocazione cervicale e la decapitazione e metodi chimici come l'inalazione di CO₂ al 70%. Non è ammessa l'eliminazione dell'animale ponendolo vivo in congelatore.

Eliminazione delle carcasse, scarti animali e materiale di scarto.

- * Le carcasse e gli scarti animali vanno racchiusi in appositi sacchi recanti la scritta "Rifiuti speciali ospedalieri" posti in contenitori rigidi di cartone. Tali sacchi possono essere stoccati in appositi congelatori a -20°C, quindi trattati con disinfettanti prima di essere confezionati nei contenitori di cartone.
- * Gli escrementi e le lettiere sporche, confezionati anch'essi in appositi sacchi, dovrebbero essere sterilizzati in autoclave quindi posti nei contenitori di cartone.
- * Questi, per poter accedere agli impianti di incenerimento, devono essere accompagnati da un'apposita dichiarazione scritta del Responsabile del Laboratorio dalla quale risulti la natura e la provenienza dei rifiuti stessi e l'avvenuto trattamento di disinfezione con paraldeide o di sterilizzazione in autoclave.
- * Ditte specializzate provvedono periodicamente a trasferire questi rifiuti agli inceneritori o a discariche di stoccaggio.

GESTIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI DA SOTTOPORRE AD ANALISI MICROBIOLOGICA

Beatrice Pasolini

Laboratorio Alimenti, Istituto Superiore di Sanità

Introduzione

La legislazione relativa al controllo ed alla vigilanza sulla produzione e commercializzazione di prodotti alimentari è continuamente sottoposta a revisione ed aggiornamenti, allo scopo di adeguarla alle frequenti modifiche delle normative soprattutto in ambito comunitario.

La legge 283/62 e successive modifiche ed il DPR 327/80 costituiscono però le normative basilari che regolano la tutela igienico-sanitaria degli alimenti.

Tuttavia di notevole importanza risultano sia il D.P.R. 777/82 (modificato dal DL. n. 108/92) sui materiali ed oggetti destinati a venire in contatto con gli alimenti, che il D.Lgs n.109/92 riguardante l'etichettatura degli stessi ed il D.Lgs n.123/93 sui controlli ufficiali.

Al fine di rendere omogenee e affidabili i dati da utilizzare per i controlli ufficiali e quindi i controlli stessi deve essere predisposto un sistema di assicurazione della qualità basato sull'attuazione di procedure articolate in tutte le fasi del controllo, dal prelievamento dei campioni al trasporto in laboratorio, dall'archiviazione agli accertamenti analitici, fino allo smaltimento dei residui. Durante tale "iter", l'identificazione e l'integrità di tutti i campioni devono essere assicurate.

Pertanto il PAQ o programma di assicurazione della qualità deve prevedere le adeguate procedure e contenere le relative documentazioni.

Il campionamento è un momento molto importante del controllo; tenendo presente che:

- un campionamento errato invaliderà i risultati analitici, anche se conseguiti con metodi idonei ed applicati in maniera corretta;
- dall'esame di una parte (campione, unità campionaria) vengono estrapolate le informazioni atte a giudicare l'idoneità o meno di tutto l'insieme (lotto, partita) del prodotto.

Ogni procedura di campionamento si articola in due fasi:

- 1) la elaborazione del Piano di campionamento;
- 2) la descrizione delle modalità operative e strumentali per realizzarlo.

Risulta ovvio dire che il piano di campionamento deve garantire un campione rappresentativo del lotto.

Perciò è evidente l'importanza di una corretta pianificazione del campionamento non solo per i controlli di routine (previsti dalla normativa) e per il monitoraggio, ma anche per l'emergenza ad esempio legata all'insorgenza di tossinfezioni correlabili al consumo di un determinato alimento.

In questo caso il campionamento sarà tanto più efficace quanto più mirato e tempestivo, e correlato, più che a veri e propri piani statistici, alla conoscenza di elementi epidemiologici e chimici specifici, raccolti nel corso dell'inchiesta, nonché in termini di patogenesi e caratteristiche biologiche (quali resistenza al calore, ai diversi pH, ecc.) dei germi probabilmente all'origine della tossinfezione in esame.

Considerando che la Direttiva n. 93/43 sull'igiene alimentare è innovativa in tema di vigilanza e privilegia la prevenzione, sarebbe auspicabile intensificare i controlli all'origine, anche per dar modo alla distribuzione di operare con maggiore tranquillità e sicurezza e, nel contempo garantire maggiore tutela alla salute pubblica. In parte capovolgendo l'attuale prassi basata in prevalenza su prelievi al dettaglio poco significativi dal punto di vista della prevenzione.

Tenendo presenti i diversi gradienti di pericolosità di taluni microrganismi, nonché gli effetti delle condizioni alle quali il prodotto può essere sottoposto durante o dopo il confezionamento, sul numero di tali germi, si possono mettere a punto diversi piani di campionamento, la cui severità crescerà in relazione a fattori differenti e principalmente: natura dell'alimento, sua destinazione, significatività dell'alimento stesso in relazione a problemi epidemiologici, ecc.

Importante è definire programmi che stabiliscano la tecnica di prelievo ed i criteri di accettazione o meno dei prodotti esaminati.

Per quanto concerne le modalità di prelievo dei campioni da sottoporre ad analisi microbiologica, oltre al criterio di casualità, già indicato, per assicurare la massima rappresentatività dei campioni stessi, è necessario osservare le misure atte a non alterare la "facies microbica" dell'alimento all'atto del prelievo.

Si adotteranno, pertanto, le note norme di asepsi relative alle operazioni ed agli strumenti necessari al prelievo. Il trasferimento in laboratorio dei campioni, sarà effettuato nel più breve tempo possibile, e sempre mantenendo le condizioni idonee di temperatura.

E' di fondamentale importanza all'atto del prelievo, rendere il campione omogeneo e rappresentativo dell'intero lotto il campione; soprattutto per quei prodotti o sostanze in cui il parametro da ricercare (esempio microrganismo) non è uniformemente distribuito.

Per alcuni alimenti la normativa indica il numero ed il tipo di campione da prelevare. In altri casi non ci sono leggi, per cui il personale del laboratorio dovrebbe concordare e programmare le modalità di campionamento con gli operatori preposti ad esso. Ed infine, altri prodotti richiedono modalità di prelievo particolari, ad esempio l'ordinanza ministeriale 11.10.78, nella tabella B indica le modalità di campionamento per i diversi tipi di latte, per i prodotti a base di uovo, per i gelati e preparati per gelati, per gli alimenti sfusi e preconfezionati.

Altri esempi di norme speciali da seguire per il prelievo di campioni di particolare sostanze sono:

Il Decreto ministeriale 16/12/1993 che individua le sostanze alimentari deteriorabili alle quali si applica il regime di controlli microbiologici ufficiali, all'articolo 1 precisa:

- le tipologie alimentari considerate deteriorabili e non deteriorabili
- i criteri per classificarli
- la temperatura di conservazione.

Fissa anche le temperature di trasporto e all'art. 2 stabilisce il numero di aliquote da prelevare.

Nel caso della *Listeria monocytogenes* e dell'aflatossina B₁ il D.M. 28.02.1995 stabilisce le relative procedure di campionamento.

Per il prelievo delle acque minerali si fa riferimento alla Circolare del Ministero della Sanità n.17 del 13.09.91.

La circolare del Ministero della Sanità n. 32 del 3 agosto 1985 prevede per la pasta all'uovo e per la pasta speciale di prelevare 5 unità campionarie (confezione) ed inoltre fissa la temperatura di conservazione e i limiti. Infine, per i formaggi, le modalità di prelievo e preparazione dei campioni sono descritte dal D.P.R. n. 327 e dal D.M. 21 aprile 1986 dove vengono indicati anche gli utensili e i recipienti da usare nei prelievi.

Schema di procedura per la gestione dei campioni

Scopo - Definizione delle attività inerenti la ricezione, codificazione e registrazione del campione e del materiale da saggio.

Campo di applicazione - La procedura si applica a tutti i campioni ufficiali differenziati in:

- campioni per la vigilanza;
- campioni per la revisione di analisi;
- campioni per consulenza per la Pubblica Amministrazione (alimenti destinati ad una alimentazione particolare, per Esercito, ecc.).

Personale coinvolto nella gestione dei campioni

- Un responsabile addetto al ricevimento ed alla registrazione del campione nel Servizio Ricevimento (Archivio centrale).
- Un responsabile del Laboratorio o responsabile della presa in carico dall'Archivio centrale al Settore per la conservazione del materiale da saggio.
- Un responsabile del settore addetto al ritiro del materiale da saggio dall'archivio al reparto per l'esecuzione dell'analisi.

Locali

- Servizio Ricevimento (SR) o Archivio centrale;
- Archivio del laboratorio, dove devono essere conservati tutti i materiali da saggio da destinare ai reparti per l'analisi;
- Reparti.

Documenti

- Registro SR
- Registro campioni
- Registro reparto per presa in carico materiale da saggio

Ricezione, codificazione e registrazione dei campioni.- Con queste operazioni inizia la responsabilità del Laboratorio ricevente per quanto concerne la valutazione dell'integrità, la validità dell'identificazione e la conservazione dei campioni. Pertanto sono state codificate regole precise riguardanti il ricevimento e la conservazione ulteriore dei materiali da saggio (Fig. 1)

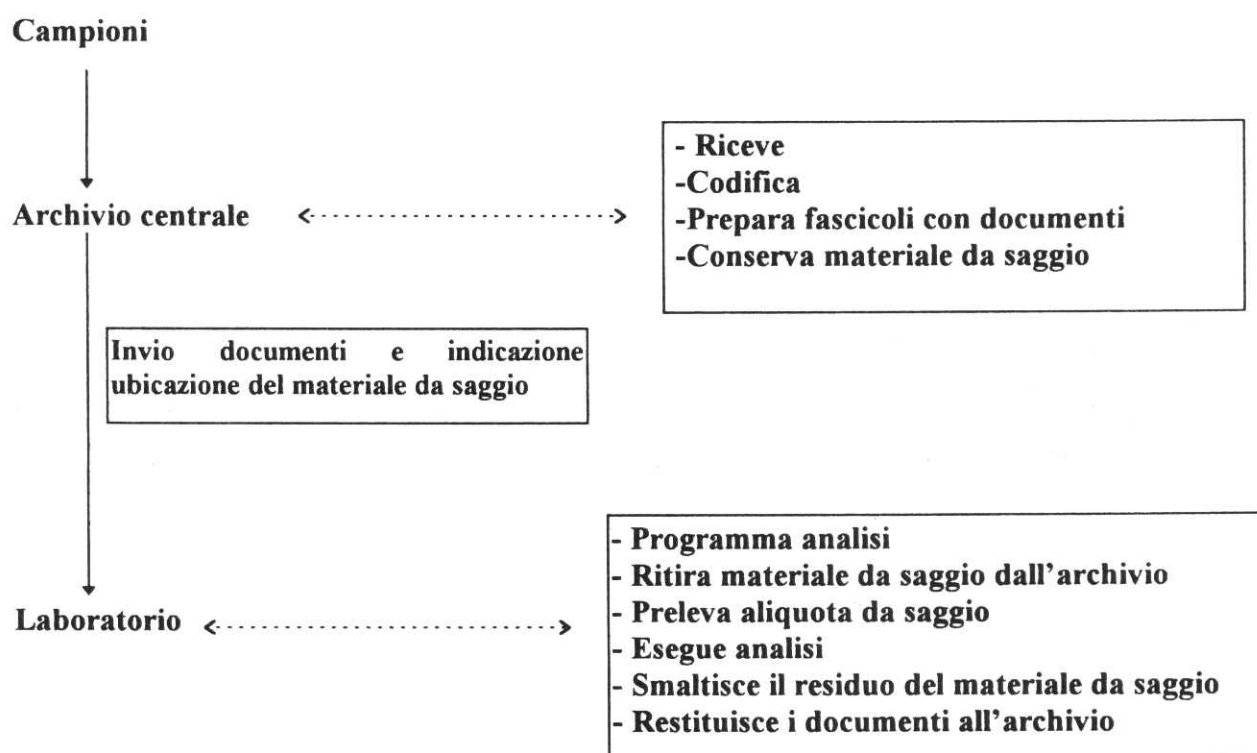


Figura 1 - Gestione dei campioni

Ogni Laboratorio deve essere dotato di un archivio centrale, dove vengono consegnati i campioni; l'incaricato della ricezione deve accertare l'integrità dei sigilli, la presenza del cartellino identificativo e la temperatura (congelato, refrigerato o T.A.) provvedendo a riportare tali dati su apposita scheda che viene allegata al campione.

Onde evitare eventuali contestazioni, l'incaricato della ricezione all'atto del ricevimento del campione con il relativo verbale di prelievo, deve indicare, la data e l'ora della consegna e lo stato di conservazione del campione stesso.

Per i campioni per i quali non risulta chiara la modalità di conservazione relativamente alla temperatura, all'atto della consegna, il responsabile dell'archivio consulta il personale tecnico del laboratorio per il parere di competenza.

Inoltre l'archivio cura la stesura di un registro dove vengono riportate tutte le informazioni utili all'identificazione univoca dei campioni, affinché gli eventuali operatori possano individuarli con facilità e senza ambiguità.

Per la codifica dei campioni si può usare un registro del tipo "a fogli numerati e insostituibili" oppure un sistema "computerizzato", periodicamente aggiornato su supporto magnetico e conservato in luogo separato ed accessibile solo da personale autorizzato.

Registro campioni - Questo registro fornisce indicazioni sulle caratteristiche di idoneità dei materiali da saggio, ivi compresa la corretta compilazione del modulo di accompagnamento; definisce le modalità di registrazione di detti materiali, nonché i limiti e le modalità di conservazione degli stessi in attesa dell'inizio dei procedimenti analitici.

Parallelamente vanno allestite etichette in materiale plastificato riportante il codice identificativo del materiale da saggio.

Questo doppio sistema di identificazione del materiale da saggio, sia per mezzo di documenti che per mezzo di una marcatura viene attuato allo scopo di evitare confusione nell'identità degli stessi. Inoltre il sistema deve garantire che i campioni in tutte le fasi, dalla registrazione alla preparazione per l'esecuzione dell'analisi non vengano deteriorati, ad esempio per contaminazione, oppure alterati nelle condizioni chimico-fisiche, ad esempio per il non mantenimento della catena del freddo.

Conservazione dei campioni e dei materiali da saggio - Subito dopo le operazioni di ricognizione e ricezione è necessario provvedere all'immediata conservazione del materiale da saggio operando con la massima accuratezza e sollecitudine. Perciò l'archivio deve essere dotato di frigoriferi congelatori e armadi per l'opportuna conservazione in relazione alla tipologia di prodotti e/o ai controlli analitici.

Le condizioni di mantenimento dei materiali da saggio devono essere tali da non modificare il numero di microrganismi presenti rispettando le normative specifiche vigenti per le diverse tipologie di alimenti.

Le temperature di mantenimento dei campioni saranno diverse in relazione alle caratteristiche chimico-fisiche dell'alimento, deperibilità, ecc.

Le condizioni di conservazione dei materiali da saggio sono previsti dal D.P.R. 327/80.

Per alcuni alimenti la normativa indica la temperatura di conservazione.

I campioni di gelati e delle sostanze alimentari congelate devono essere conservati dal momento del prelievo al momento in cui viene iniziata l'analisi ad una temperatura non superiore a -10°C .

I campioni di latte a breve conservazione (pastorizzato) ad una temperatura non superiore a $+4^{\circ}\text{C}$.

I campioni di formaggio devono mantenersi in frigorifero ad una temperatura tra 0 e $+5^{\circ}\text{C}$.

Anche per gli alimenti deperibili sono fissate le temperature di conservazione, infatti al punto 3 indica una conservazione tra 0°C e $+4^{\circ}\text{C}$ (ove non diversamente previsto da norme vigenti, -15°C per i prodotti alimentari congelati, e -18°C per i prodotti surgelati).

Per le acque minerali la temperatura di conservazione e trasporto è tra $+3^{\circ}\text{C}$ e $+5^{\circ}\text{C}$.

Tabelle riguardanti le temperature di conservazione dei prodotti alimentari sono pubblicate dalla FAO nel “Manual of food quality control”

Trasferimento del materiale da saggio in Reparto - L'archivio invia al Laboratorio, per la programmazione delle analisi i documenti relativi al materiale da saggio, conservati in un apposito fascicolo, debitamente controllato e di cui sia possibile ritrovare specifico riferimento sul registro dei campioni. Invia, inoltre, indicazioni precise sull'ubicazione del materiale da saggio nella zona di conservazione.

La programmazione delle analisi elaborata da ogni Reparto deve essere riportata su un registro conservato nel Reparto stesso, una copia del quale deve essere a disposizione della Segreteria o del personale addetto alla conservazione dei campioni e del Direttore di Laboratorio.

Il giorno stabilito per l'analisi, un incaricato (o un suo sostituto) del Reparto interessato procede al ritiro del materiale da saggio.

Dopo aver verificato che ad ogni materiale da saggio corrisponda il relativo fascicolo, si dà inizio alle procedure previste per l'analisi.

Dopo il prelievo dell'aliquota da saggio, il materiale da saggio residuo va riposto nel luogo stabilito di conservazione fino all'ottenimento dei risultati. Dopo l'espletamento delle analisi il residuo di aliquota da saggio viene smaltito con la procedura stabilita per gli RSO.

Smaltimento dei materiali da saggio - Secondo il D.P.R. 915/82 i rifiuti dei Laboratori Biologici vengono classificati come speciali e denominati RSO= Rifiuti Speciali Ospedalieri.

Per lo smaltimento seguono le disposizioni del punto “Raccolta e Trasporto di Rifiuti Ospedalieri e simili e di rifiuti provenienti da Laboratori Biologici”.

I rifiuti speciali provenienti da medicazioni o da Reparti Infettivi o che comunque presentano pericolo per la salute pubblica, ed i rifiuti speciali provenienti da Laboratori Biologici devono essere sottoposti prima del loro allontanamento ad idonei trattamenti di disinfezione o di sterilizzazione indicati e controllati dal direttore sanitario o dal responsabile del laboratorio.

Immediatamente dopo detti trattamenti i rifiuti vanno inseriti in un apposito contenitore a perdere di adeguate caratteristiche di resistenza e dotato di sistema di chiusura che eviti spandimenti accidentali del contenuto.

Tutte le scatole dovranno riportare una etichetta compilata a cura del produttore dei R.S.O. recante le seguenti informazioni:

- Rifiuto Speciale Ospedaliero (ove non prestampato sulla scatola);
- Tipo di rifiuto;
- Trattamento di sterilizzazione eseguito;
- Laboratorio o Reparto di provenienza;
- Nome del Responsabile.

Documentazione

Documentazione facente parte integrante del M.Q.

Elenco dei documenti codificati e loro collocazione.

Procedure generali di ricezione, registrazione e conservazione dei materiali da saggio.

Documentazione necessaria all'attuazione del PAQ

- Documentazione relativa al materiale da saggio durante l'iter di analisi e/o dichiarazione di assunzione di responsabilità da parte del laboratorio ricevente nel caso di trasferimento ad altro laboratorio.
- Procedura di etichettatura dei materiali da saggio.
- Procedure e tempi di conservazione delle diverse tipologie di materiali da saggio.
- Procedure sulle modalità e tempi di archiviazione post-analisi dei materiali da saggio.
- Procedure di disinfezione e sterilizzazione dei rifiuti.
- Procedure di conferimento dei rifiuti.
- Autorizzazione allo smaltimento dei rifiuti.

Definizione di alcuni termini utilizzati

Campione: Viene usato correntemente per indicare sia il materiale al momento del prelevamento, sia una quantità di materiale da analizzare, che la frazione già omogeneizzata, oppure la porzione sottoposta ad analisi. Allo scopo di unificare i termini l'AOAC, Codex e IUPAC consigliano di indicare con questa parola soltanto quella parte di lotto che viene prelevata e trasportata al Laboratorio, per l'analisi, da personale estraneo ad esso. Il campione una volta ricevuto registrato e codificato, viene definito "materiale da saggio" e la porzione di questo utilizzato per l'analisi viene definita "aliquota da saggio".

Il termine Lotto: indica una quantità di alimento prodotta, trattata e confezionata in condizioni uniformi, in un ciclo di produzione omogenea, comunque identificabile.

L'Unità Campionaria (U.C.) rappresenta la singola confezione o aliquota di prodotto facente parte di un lotto, sulla quale verrà fatta l'analisi. Per campioni casuali si intende l'insieme di Unità Campionarie selezionate da un lotto, in modo tale che ciascuna abbia le stesse probabilità di essere estratta.

Bibliografia

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) "Quality assurance principle for analytical laboratories" Washington DC 1980.
- ICMFS (International Committee on Microbiological Food Standardization) "Microorganisms in food 2, sampling for microbiological analysis" University of Toronto Press 1974
- Rizzatti Lionello, Rizzatti Egidio "Tutela igienico sanitaria degli alimenti e bevande e dei consumatori" Pirola S.p.A. 1995
- FAO Food and nutrition paper 14/12 "Manual of food quality control 12, quality assurance in food control microbiological laboratory" Food and Agriculture Organization of the United Nations - Rome 1991.