

ASSICURAZIONE DELLA QUALITÀ DEI MATERIALI E DELLE APPARECCHIATURE DI LABORATORIO

Dario De Medici, Monica Gianfranceschi
Laboratorio Alimenti - Istituto Superiore di Sanità

La qualità del dato analitico è una problematica di grande attualità nei laboratori preposti al controllo ufficiale dei prodotti alimentari, non solo in relazione al recepimento della norma UNI CEI EN 45001, secondo quanto previsto nella direttiva 93/99/CEE, ma anche in seguito al D.L.vo 123 del 3/3/93 sul controllo ufficiale dei prodotti alimentari che, per i prodotti deperibili, rimanda alle stesse strutture periferiche l'eventuale ripetizione dell'analisi di seconda istanza.

La qualità del dato analitico è correlabile a molte variabili, tra queste l'efficienza dei materiali e delle apparecchiature incide principalmente sulla ripetibilità e riproducibilità del procedimento analitico.

Alcune discordanze evidenziate nei risultati analitici, ottenuti in prove interlaboratorio, sono state correlate alle differenze di produttività e selettività dei terreni di coltura utilizzati (Mossel et al 1983, Mossel 1991).

I parametri che incidono sulla qualità dei terreni di coltura (Mossel et al 1980) possono essere espressione delle loro proprietà chimico-fisiche (fattori intrinseci), oppure dell'ambiente in cui questi vengono incubati (fattori estrinseci) o infine di altri parametri, strettamente legati ai fattori già esposti, che a loro volta selezionano la crescita batterica (fattori impliciti).

I più importanti parametri propri del terreno (fattori intrinseci) sono: il tipo e la quantità di nutrienti disponibili, l'Eh del terreno (sia dopo preparazione che durante l'incubazione), il pH iniziale e la capacità tamponante, la water activity, il tipo e l'attività dei componenti ad attività antimicrobica aggiunti come supplementi o facenti parte della composizione del terreno e le sostanze antimicrobiche che fortuitamente possono formarsi nel terreno per operazioni non ben effettuate (p.e. eccessivo riscaldamento).

I fattori estrinseci sono tutti quei parametri che influenzano la fase di incubazione quali la temperatura e la sua fluttuazione, l'umidità, la pO_2 e la pCO_2

Infine i principali fattori impliciti che possono influenzare la produttività e la selettività del terreno di coltura sono: la dipendenza nutrizionale dei microrganismi, i fenomeni di antagonismo (Mossel et al 1978) o di sinergismo batterico (Moon & Reinbold 1976). Tutti questi fattori possono e devono essere continuamente monitorati attraverso un piano continuo di controllo dei terreni di coltura e delle apparecchiature utilizzati nelle determinazioni microbiologiche.

Terreni colturali e reagenti

I terreni colturali, i reagenti e le soluzioni utilizzati per la esecuzione delle prove analitiche devono essere preparati in accordo con le procedure operative standard descritte nelle metodiche analitiche. Inoltre devono essere previsti criteri per l'acquisto, la codifica e il controllo di qualità dei materiali usati e schede di controllo delle operazioni di preparazione dei terreni colturali, dei reagenti e delle soluzioni.

Criteria per l'acquisto dei materiali. - Di norma devono essere scelti quei fornitori che mantengono accuratamente sotto controllo tutte le fasi produzione, secondo quanto stabilito dalla norma UNI EN 29002, dall'approvvigionamento delle materie prime al monitoraggio delle fasi critiche di produzione e al controllo di qualità dei prodotti finiti.

Inoltre tutte le confezioni dei prodotti devono essere accompagnate:

- dalla descrizione della composizione
- dalle istruzioni complete per l'uso
- dalle modalità di conservazione
- dalla data di scadenza.
- dalle documentazione sulle condizioni di temperatura durante il trasporto.
- dalle indicazioni di un eventuale cambiamento dei componenti

In ottemperanza al D.L.vo 626/94 (G.U. Repubblica Italiana), le ditte devono poter fornire per i prodotti contenenti sostanze pericolose schede di sicurezza suddivise nei seguenti punti:

1. identificazione del prodotto e della società
2. informazioni relative ai diversi componenti
3. identificazione dei pericoli
4. misure di pronto soccorso
5. misure antincendio
6. misure da adottare in caso di versamento accidentale
7. precauzione per la manipolazione e la conservazione
8. protezione del personale e caratteristiche dei mezzi di protezione
9. proprietà chimico-fisiche
10. stabilità del prodotto e reattività
11. informazioni tossicologiche
12. informazioni ecologiche
13. informazioni sulle possibilità di smaltimento dei rifiuti
14. informazioni relative al trasporto
15. informazioni relative alle disposizioni di legge
16. altre informazioni

Tali schede devono essere richieste dal responsabile di settore alla ditta produttrice e devono essere disponibili in laboratorio.

Codifica dei materiali.- Il terreno o il reagente all'arrivo in laboratorio deve essere annotato sull'apposito registro dei materiali in cui devono essere riportate le seguenti informazioni:

1. Tipo di materiale
2. Fornitore
3. Codice del materiale
4. Numero di lotto
5. Numero delle confezioni arrivate
6. Data di arrivo

7. Data di scadenza
8. Riferimento alla scheda di sicurezza fornita dalla ditta
9. Data di apertura di ogni singola confezione
10. Localizzazione (armadi, frigoriferi, ecc.)
11. Risultati degli eventuali test di controllo (produttività e selettività) effettuati sul lotto

Scheda di controllo delle operazioni di preparazione dei terreni di coltura. - Il controllo di qualità dei terreni di coltura deve essere accurato e continuo; solo così è possibile svelare immediatamente eventuali errori e quindi impedire che i risultati finali della determinazione microbiologica possano essere influenzati negativamente. Il controllo di qualità dei terreni deve individuare due eventuali cause di difetto, la prima dovuta a cause di imperfezione nella preparazione del terreno da parte della ditta fornitrice, la seconda relativa alla non idonea preparazione del terreno in laboratorio.

Durante la preparazione dei terreni colturali i più comuni errori che possono essere effettuati sono i seguenti:

1. non corretta pesata delle polveri disidratate
2. utilizzo di polveri disidratate che hanno subito un deterioramento dovuto alla loro esposizione a fattori ambientali sfavorevoli (calore, umidità)
3. non corretta misura del volume d'acqua, l'utilizzo di acqua non distillata o proveniente da sistemi di distillazione non ben funzionanti
4. uso di vetreria non ben lavata, contaminata con detergenti o altre sostanze chimiche
5. incompleta miscelazione o solubilizzazione degli ingredienti
6. uso di temperatura troppo elevata durante la preparazione e la sterilizzazione. Il surriscaldamento può portare ad una perdita della produttività del terreno dovuta all'idrolisi dell'agar, alla caramellizzazione dei carboidrati, all'abbassamento del pH.
7. errata determinazione del pH.
8. aggiunta dei supplementi a temperatura impropria che può causare:
 - perdita dell'efficacia delle proprietà selettive o elettive del supplemento, se aggiunto a temperatura troppo alta;
 - cattiva distribuzione del supplemento nel terreno se questo viene aggiunto ad una temperatura troppo prossima a quella di solidificazione.

Alcuni delle operazioni errate sopra descritte possono essere evitate o individuate prima dell'utilizzo del terreno di coltura, con l'accurata registrazione delle operazioni di preparazione e con il controllo di qualità dei terreni (Tab 1).

Controllo della sterilità dei terreni di coltura. - Il controllo della sterilità deve essere effettuato ogni volta che si prepara il terreno di coltura. Per ogni quantitativo di terreno preparato si devono prelevare a random un certo numero di piastre o provette e si devono incubare per 2-5 giorni alla temperatura consigliata.

Di norma si prelevano 3 piastre/provette se la quantità di terreno preparato è inferiore alle 100 unità e 10 piastre/provette per quantitativi superiori.

Controllo di qualità dei terreni di coltura. - Per ogni terreno di coltura deve essere prevista una scheda di controllo così strutturata:

1. Composizione
2. Preparazione
3. Proprietà fisiche (aspetto, pH)
4. Conservazione (tempo e temperatura)
5. Metodo di inoculazione e incubazione
6. Lettura e interpretazione dei risultati
7. Metodo per la valutazione della qualità (produttività e selettività)

Una parte delle informazioni necessarie per la elaborazione di tali schede potranno essere acquisite dalle monografie riportate dalla *Pharmacopoeia of Culture Media for Food Microbiology* (Baird et al 1987, Curtis et al 1993). Un esempio di scheda è riportato in Tab. 2

Tabella 2 - Esempio di scheda relativa alla procedura di controllo di qualità dei terreni di coltura.

Terreno	Baird Parker agar
Composizione e preparazione:	Vedi Metodi d'analisi
Proprietà fisiche: aspetto:	Il terreno completo appare di colore crema opaco.
pH	Terreno base 6,8-7,0 a 25°C
Metodo di inoculazione e incubazione:	Vedi Metodi d'analisi
Lettura dei risultati ed interpretazione:	Vedi Metodi d'analisi
Controllo di qualità	
√ Produttività: Microorganismi test:	<i>Staphylococcus aureus</i> CMCC 2656 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538
Metodo di inoculazione:	Miles-Misra modificato utilizzando Baird-Parker Agar e Heart Infusion Agar.
Criterio di valutazione:	Il numero di colonie cresciute su Baird-Parker agar non deve essere inferiore di 0,5 log ₁₀ rispetto al numero di colonie cresciute su Heart Infusion agar. Quando questa differenza è superiore a 0,5 log nella conta dello <i>Staphylococcus aureus</i> CMCC 2656 il terreno completo contenente sulfametazina risulta carente in piruvato.
√ Selettività: Microorganismi test	<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 5398 <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 8043 <i>Escherichia coli</i> ATCC 11775/ NCTC 9001 <i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906 <i>Staphylococcus epidermidis</i> NCTC 1466
Metodo di inoculazione	Vedi Metodi d'analisi
Criterio di valutazione	Il numero delle colonie cresciute su Baird-Parker agar dovrebbe essere inferiore di 3,0 log ₁₀ rispetto al numero di colonie cresciute su Heart Infusion agar, ad eccezione del <i>Staphylococcus epidermidis</i> dove il recupero deve essere di 5 log ₁₀ .
√ Caratteristiche delle colonie:	Colonie nere brillanti di oltre 3 mm di diametro (dopo 48 h) circondate da un margine biancastro continuo e da un alone di chiarificazione.

Metodi per la valutazione della qualità dei terreni di coltura. - I metodi utilizzati devono essere idonei a valutare la produttività e la selettività dei terreni da saggiare. Si intende con:

Produttività: la capacità del microrganismo ricercato di crescere sul terreno saggiato.

Selettività: la capacità del terreno di selezionare la crescita dei microrganismi interferenti.

Sono stati proposti vari metodi per la valutazione della qualità dei terreni di coltura (Curtis, 1985), i più utilizzati sono:

- per i terreni solidi o solidificati: il metodo di Miles-Misra modificato (Corry, 1982) e il metodo ecometrico (Mossel et al 1980, Mossel et al 1983)
- per i terreni liquidi: i metodi precedenti utilizzati, dopo aggiunta di agar al terreno liquido, oppure il metodo di diluizione (Richard, 1983).

Metodo di Miles-Misra modificato (spatolamento in superficie)

Preparare diluizioni scalari decimali, in soluzione salina peptonata, di colture di microrganismi test in fase stazionaria.

Preparare piastre di terreno test e di terreno di riferimento (p.e. Triptone Soya Agar) di 4 mm di spessore. Far asciugare accuratamente la superficie dell'agar prima dell'utilizzo e suddividere il fondo delle piastre in quadranti (Fig 1).

Usando una pipetta calibrata distribuire quattro gocce di ciascuna appropriata diluizione, per ciascun microrganismo, sulla superficie di quattro piastre di terreno test e 4 piastre di terreno di riferimento.

Spatolare ogni goccia nel proprio quadrante partendo dalla diluizione più elevata.

Incubare le piastre alle condizioni specificate nei metodi di analisi.

Valutare i risultati visualmente per numero ed aspetto delle colonie (al fine di avere un errore statistico accettabile il test deve essere condotto in modo da avere una conta media effettuata su tre repliche di 100 colonie).

Metodo ecometrico (metodo semiquantitativo).

Preparare colture in fase stazionaria in Brain Heart Broth dei ceppi di riferimento.

Preparare piastre del terreno di prova e del terreno non selettivo di riferimento (normalmente allo scopo viene utilizzato Triptone Soya Agar) di 4 mm di spessore. Far asciugare accuratamente la superficie dell'agar prima dell'utilizzo.

Suddividere una piastra da 9 cm di diametro come riportato in Fig. 2. Eseguire con ogni microrganismo-test strisci utilizzando un'ansa da 1 μ l, tracciando 5 linee parallele su ogni quadrante, ed infine una linea di 4 cm di lunghezza passante per il centro.

Incubare le piastre alle condizioni indicate nei metodi di analisi.

La valutazione della crescita viene riportata come indice di crescita assoluta (AGI), così come indicato da Mossel et al (1983), definito come il numero di linee dove si evidenzia crescita batterica. Ad ogni linea viene dato convenzionalmente il valore di 0.2; quindi se si verifica crescita in tutte e cinque le linee di un quadrante il valore da attribuire sarà 1. Il punteggio massimo è 5 quando su tutte le linee dei quattro quadranti e sulla linea centrale si nota crescita.

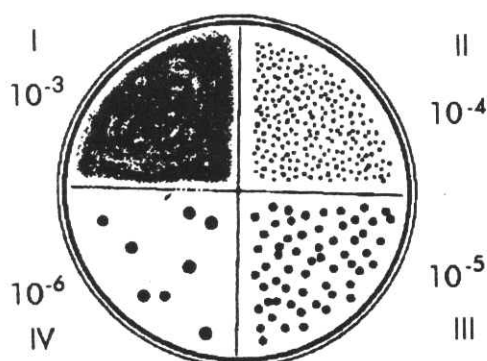


Figura 1 - Metodo di Miles Misra modificato: suddivisione della piastra ed esempio di diluizioni saggiate.

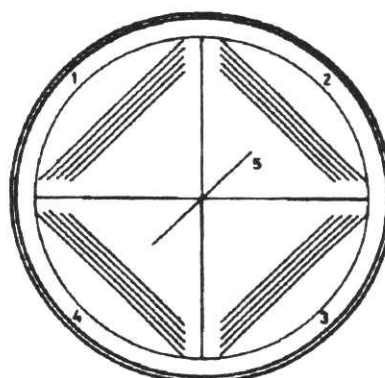


Figura 2 - Metodo ecometrico: schema da utilizzarsi per l'effettuazione degli strisci.

Metodo di diluizione (terreni liquidi) . - Per la valutazione della produttività e della selettività dei terreni liquidi possono essere utilizzati i metodi precedentemente descritti agarizzando opportunamente il terreno test. In alternativa può essere utilizzato il metodo di diluizione:

Preparare una cultura dei microrganismi test in fase stazionaria

Effettuare diluizioni fino a 10^{12} in Tryptone Soya broth.

Aggiungere 1 ml delle diluizioni a 9 ml di terreno test e di terreno di riferimento.

Alternativamente si possono utilizzare piastre microtiter con fondo ad U. In questo caso seminare 0,15 ml per ogni diluizione in otto differenti pozzetti contenenti sia il terreno test che quello di riferimento.

(Il test, per avere un basso errore statistico, deve essere effettuato utilizzando serie di tre provette o pozzetti)

Incubare come indicato nei metodi d'analisi.

I risultati sono valutati, dopo appropriata incubazione, per la presenza o assenza di crescita.

Per i terreni torbidi, come il brodo al tetratoato, la crescita può essere evidenziata aggiungendo una goccia di soluzione di resazurina (0.005% p/v in una soluzione 20% di glucosio e fosfato di potassio 5 mM pH 7).

Dopo aggiunta del reattivo, le piastre a 37°C per 2-3 ore.

I risultati numerici vengono ricavati utilizzando le tabelle dell'MPN.

Criteri di valutazione della selettività e produttività dei terreni di coltura.- Sono stati proposti vari criteri per la valutazione dei risultati ottenuti con i metodi descritti.

Vengono riportati in Tab. 3 i criteri di valutazione recentemente proposti da Weenk (1992) in una monografia a cui si rimanda per una più approfondita conoscenza dell'argomento.

Tabella 3 - Criteri per la valutazione della produttività e selettività dei terreni di coltura solidi.

Terreno	Microrganismo test	Miles -Misra ^{a,b} $\log M_{ref} - \log M_{test}$	Ecometrico ^{a,b} $AGI_{ref} - AGI_{test}$
Non- selettivo		$\leq 0,7$	≤ 1
Selettivo	Ricercato	$\leq 1,0$	≤ 1
Selettivo	Non Ricercato	$\geq 5,0$	4-5

M media del numero delle colonie.

AGI indice di crescita assoluta

a I test devono essere ripetuti due o tre volte in parallelo (per il test Miles Misra con una conta di almeno 100 colonie per piastra).

b Gli stessi criteri possono essere applicati quando si utilizza il metodo di diluizione per la valutazione della selettività e produttività dei terreni liquidi.

Scelta dei ceppi test.- I ceppi test da utilizzare nel controllo di qualità dei terreni di coltura sono preferibilmente ceppi commercializzati da organismi riconosciuti a livello internazionale, quali l'ATCC, NCTC ed altri.

Rimandiamo alle tabelle riportate dalla *Pharmacopoeia of Culture Media for Food Microbiology* e dalla *Pharmacopoeia of Culture Media for Food Microbiology: Additional monographs II*, pubblicate su *Intern. J. Food Microbiol* 1987, 5, 297-299 e 1993, 17, 201-266. dove vengono riportati l'elenco dei ceppi test consigliati.

anche utilizzati ceppi "selvaggi" isolati da alimenti,

I ceppi "selvaggi" isolati da alimenti quando perfettamente caratterizzati, possono essere utilizzati a questo scopo perchè sono di semplice ed economica reperibilità. La stessa commissione che ha elaborato la *Pharmacopoeia* prima descritta non esclude il loro inserimento nelle sue revisioni.

E' in discussione a livello di O.M.S. la possibilità di selezionare ceppi di riferimento "selvaggi" e di creare una rete di distribuzione alternativa alle collezioni internazionali.

I ceppi di collezione hanno comunque il vantaggio di essere ben definiti sia tassonomicamente che biochimicamente quindi sono utili per effettuare prove di

comparazioni tra terreni preparati in diversi laboratori, o per comparare i risultati di test effettuati dalla ditta fornitrice.

Conservazione dei ceppi.- I ceppi possono essere conservati o effettuando passaggi periodici di colture mantenute normalmente su provette di terreno appropriato solidificato "a becco di clarino" o congelati (Sambrook et al 1989).

La maggior parte dei batteri può essere conservata a bassa temperatura per alcuni (-20°C) o molti (-70-80°C) anni in un terreno contenente il 15% di glicerolo, senza significativa perdita di vitalità.

Conservazione dei terreni di coltura preparati.- Il tempo di validità dei terreni di coltura preparati varia notevolmente a seconda dei casi. Regola generale è che tutti i terreni preparati siano tenuti al riparo della luce, e in contenitori sigillati per evitare la perdita di umidità e non devono essere mai congelati.

Smaltimento dei terreni di coltura.- E' importante tener presente che qualunque coltura batterica, sia essa inoculata deliberatamente o accidentalmente, porta alla produzione di un gran numero di microrganismi e che qualunque microrganismo se presente in condizione elevata è un potenziale pericolo e deve essere eliminato con sicurezza e con procedure appropriate. Lo smaltimento deve essere effettuato in conformità al DPR 915/82 in materia di rifiuti speciali e D. L.vo 45 del 10/2/1989 che indica le procedure per lo smaltimento dei materiali da laboratorio.

Anche i terreni colturali non inoculati, che devono essere eliminati, ad esempio perché scaduti, devono essere trattati come quelli inoculati in quanto possono contenere sostanze pericolose o potenzialmente pericolose, in questo caso ci si può rifare alle schede di sicurezza che accompagnano le confezioni di terreni colturali, dove vengono date le indicazioni per il corretto smaltimento dei terreni contenenti sostanze pericolose.

Apparecchiature.

La manutenzione e la taratura della strumentazione presente in un laboratorio di microbiologia sono operazioni particolarmente importanti non solo per assicurare la qualità del risultato analitico, ma anche per garantire una maggiore efficienza nel tempo della strumentazione. Infatti l'attivazione di adeguate procedure operative standard di manutenzione è estremamente importante in quanto recenti indagini hanno dimostrato che in molti Paesi più del 60% (WHO, 1994) della strumentazione da laboratorio è inutilizzata a causa di mancata o non corretta manutenzione.

Criteri per l'acquisto delle apparecchiature.- Quando si ravvisa la necessità di acquistare una nuova apparecchiatura si deve condurre una accurata indagine di mercato per acquisire l'elenco delle ditte fornitrici. Il vaglio delle offerte ricevute è di competenza del direttore del settore coadiuvato dal responsabile della PAQ, e deve individuare, sulla base degli obiettivi analitici e del rapporto qualità/costo, l'apparecchiatura più idonea alle esigenze di laboratorio.

Come per i materiali di laboratorio anche le apparecchiature devono essere fornite di regola da ditte specializzate che mantengono accuratamente sotto controllo la loro produzione secondo quanto stabilito la norma UNI-EN 29002 "*Criteri per l'assicurazione di qualità nella fabbricazione ed installazione*"

L'acquisto di ogni apparecchiatura deve essere subordinata alla valutazione preventiva delle seguenti considerazioni:

- precisione e campo di misura idonei all'utilizzo a cui è destinata
- affidabilità e facilità d'uso
- miglior rapporto qualità-costo
- garanzia di potersi rifornire con facilità ed in tempi brevi di parti di ricambio, materiali di consumo, ecc.
- adeguati piani di manutenzione e taratura concordati con la ditta (a tale riguardo può essere stipulato, al momento dell'acquisto un contratto di manutenzione e taratura, oppure può essere prevista nei contratti d'acquisto la partecipazione di personale interno a corsi di manutenzione e taratura organizzati dalla ditta costruttrice, nonché la possibilità di avvalersi di una linea telefonica di assistenza tecnica per la diagnosi del guasto e l'opportuno intervento.)
- adeguata documentazione riportante le seguenti informazioni:
 - * lavori scientifici basati sull'utilizzo della apparecchiatura.
 - * elenco dei laboratori già in possesso dell'apparecchiatura, in modo da consentire lo scambio di informazioni con gli utilizzatori.

E' opportuno prevedere nei contratti d'acquisto di apparecchiature di un certo grado di complessità l'inserimento di alcune clausole quali:

- il rispetto dei tempi concordati per la fornitura e l'installazione della apparecchiatura e per l'esecuzione degli interventi tecnici successivi.
- La garanzia di potersi rifornire con facilità e in tempi brevi di parti di ricambio, materiale di consumo, ecc.

Inoltre prima dell'acquisto deve essere ben definito il posizionamento dello strumento all'interno del laboratorio in particolare si dovrà valutare che:

- lo spazio e la localizzazione siano sufficienti ed idonei per l'attuazione delle POS
- le condizioni ambientali (temperatura e l'umidità) siano adeguate.
- siano rispettate le norme di sicurezza sia in rapporto ad eventuali rischi ambientali (dissipazione di aerosols, sostanze tossiche o radioattive) che alla adeguatezza dei sistemi di supporto (sistema elettrico, idraulico ecc.)

Quest'ultimo punto è anche puntualizzato dal già citato D. Lvo 626/94, che al Titolo III "Uso delle attrezzature di laboratorio" definisce che:

“all'atto della scelta delle attrezzature il datore di lavoro prende in considerazione:

- a) le condizioni e le caratteristiche specifiche del lavoro da svolgere,
- b) i rischi presenti nell'ambiente di lavoro;
- c) i rischi derivanti dall'impiego delle attrezzature stesse.”

Per le apparecchiature già in dotazione del laboratorio deve essere prevista l'adeguamento a tutte quelle specifiche tecniche che soddisfino i requisiti di qualità richiesti.

Registrazioni. - Ogni apparecchiatura presente in laboratorio deve essere registrata in un apposito elenco codificato delle apparecchiature in cui sono indicate:

- le specifiche degli apparecchi
- i nomi dei responsabili
- la loro collocazione
- la frequenza delle operazioni di verifica dell'efficienza
- la collocazione del manuale d'uso/manutenzione della ditta costruttrice
- la collocazione del registro dell'apparecchiatura

Inoltre nel registro dell'apparecchiatura si devono riportare le seguenti informazioni:

1. estremi dell'apparecchiatura

- * nome dell'apparecchiatura
- * nome del fabbricante, nonché indirizzo e il numero telefonico relativo al servizio di assistenza tecnica
- * identificazione del tipo e numero di serie
- * il nome del programma e il numero di licenza se l'apparecchio è provvisto di software.
- * data di ricevimento
- * data di messa in servizio (installazione e collaudo)
- * collocazione
- * dimensione e peso
- * stato al momento del ricevimento (nuova, usata e ricondizionata)
- * libretto di istruzione

- 2. elenco del personale autorizzato all'uso e del personale responsabile dei programmi di manutenzione e taratura
- 3. procedure codificate di manutenzione, se non riportate sul manuale d'uso, con i relativi interventi da adottare in caso di inefficienza
- 4. elenco cronologico degli interventi esterni (manutenzione e/o taratura effettuati ed i relativi rapporti tecnici)
- 5. schede mensili di manutenzione e taratura in cui vengono definiti:
 - * il responsabile dei controlli
 - * il programma di manutenzione (tipo frequenza)
 - * il programma di taratura (tipo di taratura: interna o esterna, iniziale o successive e frequenza)
 - * gli interventi da adottare in caso di inefficienza

- * l'elenco cronologico dei difetti riscontrati e degli interventi effettuati da personale interno.

Inoltre deve essere previsto una segnalazione visiva da applicare all'apparecchiatura quando questa è fuori uso (le apparecchiature che forniscono risultati di prova dubbi o che risultino difettose a seguito di taratura o per altre ragioni, devono essere messe fuori servizio e opportunamente etichettate e nel caso poste in apposito locale fino a quando non saranno state riparate) Il responsabile dello strumento deve provvedere ai necessari interventi (diagnosi, sostituzione di componenti, richiesta di assistenza tecnica esterna).

Come già ricordato precedentemente il D. L.vo 626/94 regola, tra l'altro, la sicurezza per quanto riguarda l'utilizzo delle apparecchiature di Laboratorio. Tale D.Lvo fa obbligo al datore di lavoro di prendere le misure necessarie affinché le attrezzature di lavoro siano:

1. installate in conformità alle istruzioni del fabbricante
2. utilizzate correttamente
3. oggetto di idonea manutenzione
4. correlate di apposite istruzioni d'uso

Inoltre "qualora le attrezzature richiedano per il loro impiego conoscenze o responsabilità particolari in relazione ai loro rischi specifici, il datore di lavoro si assicura che:

- a) l'uso dell'attrezzatura di lavoro è riservato a lavoratori all' uopo incaricati
- b) in caso di riparazioni, di trasformazioni o manutenzioni il lavoratore interessato è qualificato in maniera specifica per svolgere tali compiti"

Manutenzione e taratura.- Nell'ambito della strumentazione presente in un laboratorio di microbiologia preposto al controllo ufficiale dei prodotti alimentari, occorre fare una prima distinzione tra le apparecchiature che determinano una misura e quindi soggette a taratura e/o a verifica della taratura e apparecchiature di processo in cui è possibile o necessario effettuare soltanto verifiche di efficienza e/o buon funzionamento.

In un laboratorio microbiologico le principali apparecchiature di misura sono tra l'altro il pHmetro, lo strumento per la misurazione dell'activity water, lo spettrofotometro, le bilance tecniche ed analitiche.

Mentre le apparecchiature di processo sono l'autoclave, la stufa a secco, i termostati, gli incubatori ad acqua, il microscopio e la centrifuga.

Per ogni apparecchiatura devono essere previste schede mensili di manutenzione e taratura, che sarà opportuno collocare temporaneamente nei pressi dell'apparecchiatura in considerazione del fatto che su tali schede devono essere annotati giorno per giorno i risultati dei controlli effettuati dal personale di laboratorio, i difetti riscontrati e gli interventi adottati. Tali schede saranno archiviate periodicamente (a fine di ogni mese) nel registro della apparecchiatura.

LINEE GUIDA SULLE PROCEDURE DA ADOTTARE PER IL CONTROLLO, LA MANUTENZIONE E LA TARATURA DI ALCUNE APPARECCHIATURE CONSIDERATE DI BASE IN UN LABORATORIO MICROBIOLOGICO PER IL CONTROLLO UFFICIALE DEI PRODOTTI ALIMENTARI:

Autoclave

Caratteristiche.- L'autoclave deve essere fornita di adeguati indicatori di temperatura e/o di pressione, preferibilmente collegati a registratori continui. Il termometro interno calibrato deve essere collocato in modo da registrare la temperatura più bassa all'interno della camera di sterilizzazione.

Per il corretto uso dell'autoclave ci si deve attenere scrupolosamente alle indicazioni del costruttore.

Installazione.- Le autoclavi devono essere installate in un apposito locale provvisto di impianto di aerazione per l'abbattimento dei vapori.

Schede.- Deve essere prevista una carta di controllo in cui vengono riportate:

- il tempo e la temperatura di sterilizzazione programmati dall'operatore
- il tipo di materiale da sottoporre a sterilizzazione
- il tempo e la temperatura o la pressione registrati dall'apparecchio. (se l'apparecchio è corredato di registrazione in continuo, in caso contrario definire una procedura di lettura visiva della temperatura o pressione e registrazione dei dati)
- data e ora in cui ha inizio la sterilizzazione
- nome e cognome dell'operatore

Tale scheda può essere unificata con quella della preparazione dei terreni (Tab 1)

Procedure Operative Standard (POS)

Procedura 1: controllo

Oggetto: temperatura e sterilità

Frequenza: giornaliera

Il funzionamento adeguato delle autoclavi deve essere controllato utilizzando indicatori biologici o chimici. Gli indicatori biologici sono sicuramente più utilizzati. L'OMS raccomanda l'uso del *Bacillus Stearotherophilus* ATCC 1953. Per gli indicatori chimici vengono consigliati i tubi di Browne.

Procedura 2: manutenzione ordinaria

Oggetto: pulizia

Frequenza: mensile

La manutenzione ordinaria prevede un lavaggio con acqua e detergente seguito da risciacquo (nel caso di autoclavi di vecchio tipo occorre eseguire lo svuotamento del liquido contenuto).

Le guarnizioni delle porte devono essere pulite e regolarmente controllate per verificare eventuali deterioramenti.

Le eventuali chiusure manuali devono essere lubrificate periodicamente con grassi resistenti alle alte temperature.

Il funzionamento dei manometri deve essere controllato almeno ogni tre mesi.

Le valvole devono essere ispezionate per verificarne l'usura e le eventuali rotture.

Procedura 3: manutenzione

Oggetto: sicurezza

Frequenza: prima di ogni uso

Controllare che le valvole di scarico non siano ostruite da corpi estranei (p.e. carta)

Procedura 4: taratura

Oggetto temperatura e pressione.

Frequenza: al momento dell'installazione e periodicamente in funzione delle caratteristiche e dei carichi di lavoro.

I manometri e i termometri devono essere controllati utilizzando sonde di precisione tarate e certificate.

Cappa a flusso laminare

Caratteristiche.- Le cappe di sicurezza vengono utilizzate per assicurare un'area sterile dove sono garantite condizioni di massima sicurezza per l'operatore.

Infatti le cappe di sicurezza biologica sono l'attrezzatura principale per assicurare il contenimento fisico degli aerosols generati inavvertitamente durante le operazioni analitiche. Inoltre alcuni tipi di cappe oltre ad assicurare la protezione dell'operatore, assicurano la qualità del dato analitico in quanto garantiscono la protezione del campione da eventuali contaminazioni ambientali.

Esistono tre tipi di cappe a flusso laminare: classe I, II, III.

Le cappe che possono essere utilizzate in un laboratorio microbiologico per il controllo ufficiale dei prodotti alimentari sono principalmente del tipo II. Infatti le cappe di tipo I vengono utilizzate solo quando si vuole proteggere l'operatore, ma non i materiali situati all'interno della cappa stessa.

La cappa di sicurezza biologica di classe II è una cappa ventilata aperta frontalmente, progettata per la protezione dell'operatore, dei prodotti al suo interno e dell'ambiente circostante ed è caratterizzata da un flusso d'aria in ingresso e filtrazione sia dell'aria aspirata che espulsa.

Esistono due varianti di cappe appartenenti alla classe II: il tipo di classe IIA che fa ricircolare il 70 % dell'aria e il tipo classe IIB che ne fa ricircolare il 30 %.

Le cappe classe IIA possono essere utilizzate con microrganismi che presentino un rischio basso o moderato (gruppi di rischio 2 e 3), piccole quantità di agenti chimici tossici e radionuclidi in tracce. Mentre le cappe classe IIB sono più adatte a maggiori quantità di sostanze tossiche volatili o radioattive.

La cappa di sicurezza di classe III è una cappa ventilata , totalmente chiusa, a tenuta d'aria ed a pressione negativa. L'aria in ingresso passa per un filtro HEPA, quella in uscita passa per due filtri HEPA posti in serie. Vengono utilizzate per lavorare con microrganismi ad alto rischio (gruppo di rischio 4) e forniscono una barriera totale tra l'operatore ed il materiale manipolato.

Installazione. Le cappe devono essere installate in luoghi esenti da correnti di aria e lontane da griglie di impianti di condizionamento che possono influenzare il regime di aspirazione ed espulsione, che garantisce il corretto funzionamento dell'apparecchio.

Schede. - Deve essere prevista una scheda dove vengono riportate le ore di utilizzazione dei filtri HEPA e delle lampade UV

Procedure operative standard.

Procedura 1: Controllo

Oggetto: sterilità

Frequenza: settimanale

Occorre verificare l'efficacia della filtrazione mediante conta microbica su piastre contenenti terreni colturali per germi mesofili e miceti. Le piastre devono essere lasciate aperte sotto la cappa a funzionamento avviato, per almeno 20 minuti e quindi poste ad incubare. In caso di non conformità occorre verificare l'efficienza dei filtri.

Procedura 2.- controllo

Oggetto: sterilità

Frequenza: in funzione dell'uso

Deve essere controllata la sterilità del flusso con un apposito strumento per la conta delle particelle. In caso di non conformità i filtri vanno sostituiti.

Procedura 3 - manutenzione ordinaria

Oggetto: sterilità

Frequenza: in funzione dell'uso

Sostituire le lampade UV e i filtri HEPA quando hanno superato le ore di lavoro preventivate.

Procedura 4: manutenzione straordinaria

Oggetto: decontaminazione

Frequenza: periodica

Porre la giusta quantità di paraformaldeide in un recipiente posto su una piastra elettrica controllata dall'esterno della cappa.

Sigillare il coperchio frontale con nastro adesivo e quindi accendere il riscaldatore fino a completa vaporizzazione della formaldeide. Lasciare la cappa sigillata per tutta la notte. Al mattino accendere la ventola di scarico e aprire di pochi millimetri il coperchio frontale.

Dopo pochi minuti aprire totalmente il coperchio frontale e aspettare circa un ora con la ventola accesa.

Termostati

Caratteristiche. Il termostato deve garantire la stabilità della temperatura d'incubazione prefissata in quanto quest'ultima è uno dei più importanti fattori che determinano la buona riuscita delle analisi microbiologiche.

Installazione. Devono di norma essere installati ad almeno 20 cm dal muro e lontano da fonti di calore o dall'irraggiamento solare. Ulteriori informazioni dovranno essere acquisiti sui manuali d'installazione del fabbricante.

Procedure operative standard

Procedura 1: controllo

Oggetto: temperatura

Frequenza: giornaliera

La temperatura deve essere controllata giornalmente, mediante apposite sonde tarate, su ogni ripiano e in più punti. Per i termostati a ventilazione deve essere controllata settimanalmente la regolarità del flusso mediante flussimetro.

Procedura 2: manutenzione

Oggetto: pulizia

Frequenza: mensile

Tutte le superfici all'interno del termostato devono essere lavate e disinfettate con idoneo disinfettante non corrosivo (p.e. sali di ammonio quaternario). Semestralmente occorre eseguire una sanificazione dell'apparecchio con disinfettanti spray.

Bagni termostatici

Caratteristiche - I bagni termostatici devono garantire, come i termostati, la stabilità della temperatura d'incubazione prefissata.

Installazione - Devono di norma essere installati lontano da fonti di calore o dall'irraggiamento solare ed in luogo che permetta la dispersione del calore e comunque lontano da strumenti che possono essere danneggiati dall'eccesso di umidità.

Procedure operative standard

Procedura 1: controllo

Oggetto: temperatura

Frequenza: giornaliera

La temperatura deve essere controllata giornalmente, mediante apposite sonde tarate.

Procedura 2: manutenzione

Oggetto: pulizia

Frequenza: mensile

L'acqua contenuta negli incubatori deve essere cambiata regolarmente in modo da evitare la crescita di batteri ed alghe e le superfici interne devono essere pulite utilizzando disinfettanti idonei.

Centrifughe.

Caratteristiche: Quando si lavora con microrganismi appartenenti al gruppo di rischio 2 e 3 non devono essere mai utilizzate centrifughe con testate angolari, eccetto che in centrifughe speciali ad alta velocità, per evitare possibili fuoriuscite di liquidi.

Installazione: Vanno installate in luogo sufficientemente aerato e lontano da fonti di calore. avendo cura di lasciare almeno 30 cm di spazio intorno alla centrifuga .

Il piano deve essere perfettamente livellato e la centrifuga deve essere posizionata ad un'altezza tale da permettere a qualsiasi operatore di poter vedere chiaramente l'interno.

Schede - Deve essere prevista una carta di controllo dove vengono riportati:

- la data di utilizzo
- il tipo di rotore utilizzato
- la serie del rotore
- il numero di giri
- la tempo di centrifugazione
- il nome dell'operatore
- gli eventuali problemi riscontrati

Procedure operative standard

Procedura 1: manutenzione.

Oggetto: efficienza rotore e contenitori

Frequenza: dopo ogni utilizzo

Verificare dopo ogni centrifugazione l'eventuale fuoriuscita del materiale.

Controllare il rotore e i contenitori per evidenziare eventuali rotture, corrosioni o fessure capillari.

Procedura 2: manutenzione

Oggetto: ispezione del rotore

Frequenza: mensile

Ispezionare l'interno della centrifuga per verificare l'assenza di tracce di ruggine o corrosione all'altezza del rotore.

Microscopio ottico

Installazione - Il microscopio deve essere installato in un ambiente pulito, non umido e non caldo (l'umidità e la temperatura elevata possono provocare una contaminazione fungina che può corrodere le superfici ottiche), possibilmente in un ambiente condizionato, e lontano da solventi volatili.

Procedure operative standard

Procedura 1: manutenzione

Oggetto: pulizia

Frequenza: dopo ogni utilizzo.

Rimuovere il residuo di olio sulle lenti utilizzando apposita carta ottica.

Procedura 2: manutenzione

Oggetto: pulizia

Frequenza: settimanale

Pulire le superfici ottiche con un morbido pennello o con un soffiato.

Pulire gli obiettivi con una soluzione costituita da 40% Etere di Petrolio, 40 % di Etanolo e 20 % di Etere dietilico. (Non deve essere mai utilizzato per la pulizia delle lenti alcool al 90%, tale solvente deve essere utilizzato per la pulizia degli specchi).

Procedura 3: manutenzione

Oggetto pulizia

Frequenza: mensilmente

Pulire e lubrificare le parti meccaniche con una goccia di olio lubrificante (come da manuale d'istruzioni).

Procedura 4.- manutenzione

Oggetto: pulizia

Frequenza: mensile

Rimuovere lo sporco dalla struttura esterna con una soluzione saponosa non aggressiva. Eliminare il grasso o l'olio in eccesso sulle parti meccaniche utilizzando etere di petrolio. Pulire lo strumento utilizzando etanolo al 45-50 % (questa soluzione non deve mai essere utilizzata sulla parte ottica.).

Bibliografia

Baird R.M., Corry J.E.L., Curtis G.D.W. Pharmacopoeia of Culture Media for Food Microbiology. Intern. J. Food Microbiol. 1987, 5, 187-299

Corry J.E.L. Quality assessment of culture media by the Miles-Misra method. In: Corry J.E.L. (ed) Quality assurance and quality control of microbiological culture media. Proceedings of the Symposium. 6-7 September 1979, Callas de Mallorca. Spain pp.21-38.

Curtis G.D.W. A review of methods for quality control of culture media Intern. J. Food Microbiol 1985, 2, 13-20.

- G. U. Repubblica Italiana "Attuazione della direttiva 89/391/CEE, 89/654/CEE, 89/656/CEE, 90/269/CEE, 90/394/CEE, 90/679/CEE riguardante il miglioramento della sicurezza e della salute dei lavoratori sul luogo di lavoro" Suppl. Ordinario n. 265 del 12 Novembre 1994
- Moon N.J. & Reinbold G.W. Commensalism and competition in mixed cultures of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*. *Journal of Milk and Food Technology*. 1976, **39**, 337-341
- Mossel D.A.A. Food microbiology: an authentic academic discipline with substantial potential benefits for science and society. *J.A.O.A.C.* 1991, **74**, 1-13.
- Mossel D.A.A., Bonants-Van Laarhoven T.M.G., Ligtenberg-Mekus A.M.Th., Wedler M.E.B. Quality assurance of selective culture media for bacteria, moulds and yeast: an attempt at standardisation at international level. *Journal Applied Bacteriology* 1983, **54**, 313-327.
- Mossel D.A.A., Bijker P.G.H., Eelderink I. Streptococchi of Lancefield groups A, B, D, and those of buccal origin in foods, their public health significant, monitoring and control. In *Streptococchi*. Ed Skinner F.A. & Quesnel L.B. 1978 pp 315-334. London Academic Press.
- Mossel D.A.A., Van Rossem F., Koopmans M., Hendriks M., Verouden M. & Eelderink I. Quality of Solid Culture Media: A comparison of the classic and the so-called ecometric technique. *Journal of Applied Bacteriology* 1980, **49**, 439-454
- Richard N.. Monitoring the quality of selective liquid media use in official serial dilution technique for the bacteriological examination of food. In: Corry J.E.L. (ed) *Quality assurance and quality control of microbiological culture media*. Proceedings of the Symposium. 6-7 September 1979, Callas de Mallorca. Spain pp.51-58.
- Sambrook J, Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Laboratory Press 1989 vol. 3 page A4
- Weenk G.H. Microbiological assessment of culture media: comparison and statistical evaluation of methods. *International Journal Food Microbiol.* 1992, **17**, 159-181.
- W.H.O. Maintenance and repairer of laboratory, diagnostic imaging, and hospital equipment. World Health Organisation Geneva 1994