

CONTROLLO MICROBIOLOGICO: CRITERI E METODI ANALITICI

Anna Maria Ferrini

Laboratorio Alimenti, Istituto Superiore di Sanità

Introduzione

Le conoscenze di base della microbiologia alimentare - in particolare sulla sopravvivenza dei patogeni, le loro possibilità di sviluppo e di produzione di tossine - sono aumentate fortemente negli ultimi trenta anni. La ricerca - nello stesso periodo - ha sviluppato una ampia gamma di metodi per evidenziare e controllare microrganismi responsabili delle tossinfezioni alimentari. Tuttavia, le statistiche epidemiologiche - tra l'altro presumibilmente sottostimate - dimostrano che l'incidenza delle malattie di origine alimentare è addirittura aumentata durante lo stesso trentennio (Tab.1) ed inoltre, che il numero dei patogeni alimentari è praticamente raddoppiato (Tab.2). Le cause che continuano a sostenere l'incidenza delle tossinfezioni alimentari possono essere sostanzialmente riassunte nei seguenti punti:

- emergenza di nuovi patogeni
- correlazioni di episodi gastroenterici da patogeni tradizionali con:
prodotti alimentari di "nuova" formulazione
prodotti alimentari industriali di tipo "tradizionali"

L'incidenza degli episodi di malattie trasmesse da alimenti di produzione industriale è nettamente inferiore rispetto a quella dovuta agli alimenti preparati nei sistemi di ristorazione collettiva o di preparazione domestica, viceversa il numero delle persone potenzialmente coinvolte è notevolmente alto. È perciò necessaria la rigorosa e continua adozione di misure di controllo per prevenire le malattie trasmesse dagli alimenti ed il deterioramento conseguente agli eventuali difetti del ciclo produttivo.

Fondamentalmente esistono tre tipi di intervento per ridurre i rischi della contaminazione alimentare:

- educazione alle norme igieniche del personale addetto
- ispezione delle attrezzature e degli ambienti di lavoro
- controllo di qualità per mezzo di analisi microbiologiche e/o chimiche.

Per quanto concerne l'ultimo punto, il controllo microbiologico prevede di regola l'applicazione di Criteri Microbiologici prestabiliti. Un'analisi microbiologica comporta infatti sia il prelievo di prodotti finiti che il prelievo di campioni lungo la catena produttiva-distributiva secondo piani prefissati, la ricerca di germi patogeni ed eventuali loro tossine e di germi responsabili del deterioramento o indicativi dell'applicazione di norme di buona fabbricazione secondo metodologie standardizzate, e infine la valutazione dei risultati per accertare la rispondenza dei lotti ai limiti stabiliti.

Tabella 1 - Episodi di tossinfezione alimentare registrati negli USA nel periodo 1952 - 1982^a

Anno	EPISODI		CASI	
	N° totale	eziologia confermata	N° totale	eziologia confermata
1952 ^b	183	133	8784	6735
1957 ^b	244	109	10168	4103
1962 ^c	-----	-----	-----	-----
1967	273	160	22171	17309
1972	301	136	14559	5992
1977	436	157	9896	4072
1982	656	220	19380	11050

^a fonte: Center for Diseases Control (1973, 1979); Center for Diseases Control (1986); Dauer (1961); National Communicable Disease Center (1968); ^b Episodi causati sia da alimenti che da acqua; ^c Dati non disponibili per il 1962.

Tabella 2 - Tossinfezioni correlate eziologicamente negli USA durante gli anni 1952, 1967 e 1982^a.

AGENTE INFETTIVO	1952 ^b		1967		1982	
	No. episodi	No. casi	No. episodi	No. casi	No. episodi	No. casi
BATTERI						
• <i>Bacillus cereus</i>					8	200
• <i>Brucella spp.</i>			20	21	1	3
• <i>Campylobacter jejuni</i>					2	31
• <i>Clostridium perfringens</i>			19	2529	22	1189
• <i>Escherichia coli</i>			2	70	2	47
• <i>Salmonella typhi</i>	11	156	3	51		
• <i>Salmonella, altre</i>	31	1335	27	1249	55	2056
				4		
• <i>Shigella spp.</i>	12	1441	6	547	4	116
• <i>Streptococcus, Group A</i>					1	34
• <i>Vibrio cholerae, 01</i>					1	892
• <i>Vibrio cholerae, non 01</i>					1	7
• <i>Vibrio parahaemolyticus</i>					3	39
• <i>Yersinia enterocolitica</i>					2	188
• Totale	54	2932	77	1571	102	4802
				2		
VIRUS						
• Hepatitis A			9	196	19	325
• Norwalk					2	5000
Totale			9	196	21	5325
PARASSITI						
• <i>Entamoeba histolytica</i>			1	5		
• <i>Trichinella spiralis</i>			37	42	1	4
Totale			38	47	1	4
Totale globale	54	2932	124	1595	124	1013
				5		1

^a dati: Center for Diseases Control (1986), Dauer (1961); National Communicable Disease Center (1968); ^b tossinfezioni da alimenti e da acqua

Criteri microbiologici

Generalità - Un criterio microbiologico di un alimento è un limite specifico legato ad una caratteristica microbiologica. Definisce l'accettabilità di un processo, di un prodotto o di un lotto di prodotto, sulla base della presenza o assenza di un definito numero di determinati microrganismi e/o sulla quantità delle loro tossine o dei loro metaboliti espressa per unità di peso, volume, area o lotto.

Lo scopo di un criterio microbiologico è prevalentemente quello di proteggere la salute del consumatore, assicurandogli l'assunzione di prodotti sani e salubri, nonché di consentire l'individuazione di attività commerciali non corrette.

Un criterio deve essere tecnicamente soddisfattibile per mezzo di buone pratiche di produzione, evitando disposizioni che incoraggino l'impiego di trattamenti inammissibili destinati, per esempio, all'abbattimento delle cariche microbiche.

In definitiva, un Criterio microbiologico (fonte: Codex Alimentarius) consiste nella:

- individuazione dei microrganismi da controllare e/o delle loro tossine e/o dei loro metaboliti ed il motivo di tale scelta
- definizione dei metodi di analisi per rivelarli e/o quantizzarli
- adozione di un piano che definisca il campionamento (numero e dimensione delle unità campionarie in relazione ai limiti stabiliti, ecc.)
- adozione dei limiti di ordine microbiologico considerati adeguati per l'alimento in esame nei vari punti della catena di produzione e distribuzione.

Inoltre, nell'ambito di un sistema HACCP, tiene conto della:

- individuazione dei principali punti di applicazione (critici) dei criteri stessi
- programmazione degli interventi da adottare quando necessario, nei punti stabiliti.

Per soddisfare gli scopi di un criterio microbiologico, occorre prendere in considerazione:

- l'evidenza del pericolo (hazard) reale o potenziale o per la salute
- le condizioni microbiologiche delle materie grezze
- l'effetto del trattamento sullo stato microbiologico dell'alimento
- la probabilità e le conseguenze di una contaminazione microbica e/o di un suo incremento durante le successive fasi di manipolazione, conservazione ed utilizzo
- le categorie di consumatori esposte
- il rapporto costo/beneficio derivante dall'applicazione del criterio
- l'uso che viene fatto dell'alimento

Tipi di criteri microbiologici - Si distinguono in primo luogo "Criteri obbligatori o ingiuntivi" (Norme), i quali hanno carattere vincolante ed includono sia limiti per microrganismi patogeni che per germi particolarmente rilevanti per le condizioni igieniche dell'alimento (indicatori, agenti di spoilage). Essi vengono dedotti dalle caratteristiche microbiologiche del prodotto finito, accertate in condizioni di Buone Norme di Fabbricazione. Fanno parte delle norme i cosiddetti "Standard microbiologici".

Per le autorità sanitarie e/o gli operatori in campo alimentare, tali criteri stabiliscono una distinzione tra prodotti accettabili o non (materie prime e ingredienti, prodotti finiti, lotti).

In secondo luogo occorre considerare i "Criteri facoltativi o consultivi" (Direttive) i quali includono disposizioni non vincolanti proposte per migliorare il livello igienico della produzione alimentare, principalmente relative a microrganismi non direttamente pericolosi per la salute pubblica. Di essi fanno parte le Specificazioni microbiologiche per il prodotto finito, intese ad aumentare la sicurezza che le norme igieniche nel corso della produzione vengano osservate, ma non costituiscono una prescrizione a carattere legale richiesta dagli organi di controllo. Esse possono essere di ausilio per la formulazione di norme. Fanno parte di questi stessi criteri le Linee guida (guidelines), in particolare quelle applicabili agli stabilimenti di produzione o commerciali per l'esame di specifici punti critici, durante o dopo l'applicazione di determinati processi, al fine di controllarne il livello igienico.

In alcuni casi le direttive si possono applicare anche ai prodotti di importazione.

In funzione della valutazione del rischio per il consumatore, il punto della catena distributivo-produttiva, il tipo di prodotto specificato, le azioni di controllo facoltative possono portare all'accettazione, alla ridestinazione, al riprocessamento, allo scarto o alla distruzione del prodotto.

Scelta dei microrganismi - Dato che è impossibile tenere sotto controllo tutti i batteri, miceti, virus, protozoi e parassiti potenziali cause di malattie da alimenti, è importante mirare il controllo solo a quei microrganismi che effettivamente svolgono un ruolo determinante nella qualità microbiologica di un prodotto. Scegliere dei microrganismi sbagliati, conduce ad un falso senso di sicurezza sulla "safety" dell'alimento. Il controllo microbiologico per specie patogene specifiche deve centrare quei microrganismi che sono stati epidemiologicamente correlati al prodotto. In particolare la scelta deve venir fatta in base al tipo di alimento, alla sua storia passata (dalle materie prime, alla produzione e allo stoccaggio), alle previsioni per il deterioramento (in base alle modalità di conservazione), alla provenienza geografica.

I microrganismi inclusi in un criterio devono essere riconosciuti come rilevanti -come patogeni, come organismi indici o indicatori o come organismi responsabili di deterioramento- per l'alimento in questione e/o la sua tecnologia.

Va data la preferenza alla ricerca dei patogeni -piuttosto che ai microrganismi indicatori- quando i primi possono essere evidenziati direttamente ed in modo attendibile. Un test per un microrganismo non direttamente patogeno, deve essere finalizzato ad indicare delle insoddisfacenti pratiche igieniche o un potenziale rischio per la salute.

Patogeni - La sola presenza di certi germi potenzialmente patogeni, quali ad esempio *S.aureus* e *C.perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus*, noti agenti di tossinfezioni alimentari, non necessariamente indica una situazione di rischio immediato per il consumatore. E' noto ad esempio che tali germi si possono trovare in deboli quantità in alcune carni crude e non si sviluppano se il prodotto è correttamente refrigerato; pertanto un numero limitato di essi può essere tollerato in superficie. Per le salmonelle vale il requisito dell'assenza in tutti i tipi di prodotti.

Indici ed indicatori - Per caratterizzare in maniera più completa lo stato igienico del prodotto, oltre ai patogeni classici, è opportuno determinare una serie di altri microrganismi: microrganismi indice e microrganismi indicatori.

I microrganismi indice sono microrganismi abitualmente non patogeni, ma generalmente simili a questi per localizzazione e vie di trasmissione, pertanto la loro presenza a concentrazioni superiori a determinati limiti, è indizio di una possibile compresenza dei patogeni ecologicamente correlati.

I microrganismi indicatori sono invece microrganismi tipici delle materie prime e vengono ridotti in misura più o meno marcata durante i processi di lavorazione. In generale, la loro presenza è maggiormente tollerata rispetto agli indici, ma in modo diversificato a seconda dei vari processi produttivi. La presenza degli indicatori - a determinati livelli di concentrazione - fornisce indicazioni sulle carenze igieniche del prodotto, talvolta legate alla sua produzione, senza per questo sottintendere la possibile presenza di germi patogeni.

In generale *E.coli*, coliformi fecali ed Enterobatteriaceae sono indicatori di contaminazione per i cibi trattati termicamente. *S.aureus* in questo caso può essere utilizzato come indicatore di avvenuta manipolazione di cibi già cotti o di errato impiego della combinazione tempo/temperatura nel trattamento di alimenti a rischio.

Tuttavia, benchè i test per i microrganismi indicatori e indici debbano essere atti a svelare cattive pratiche di lavorazione oppure a far sospettare la possibile presenza di germi patogeni, non si possono dare indicazioni valide in tutte le circostanze. Ad esempio, nel caso di alcune carni crude (es. pollame) i livelli di enterobatteri totali, di coliformi, di *E.coli*, hanno importanza relativamente limitata in quanto non si riferiscono con certezza ad un comportamento igienico scorretto, nè sono sempre correlati in maniera significativa con la presenza di germi patogeni.

La conta degli Enterobatteri può essere adottata comunque come specifica per il prodotto finale, semplicemente per indicare una contaminazione eccessiva da parte di questo tipo di batteri.

Per Coliformi ed *E.coli* va tenuto presente però che mentre i primi possono essere considerati più correttamente indicatori di una contaminazione ambientale, il secondo ha la caratteristica di essere presente quasi esclusivamente nel contenuto fecale degli animali a sangue caldo, uomo compreso, avvicinandosi maggiormente ad un indice ideale.

Gli streptococchi fecali sono, rispetto ai coliformi fecali, meno specifici come ospiti del tratto intestinale e meno correlati alla presenza di eventuali enteropatogeni, dovrebbero pertanto essere prevalentemente considerati come indicatori generici della qualità igienica. Essi sono in particolare più resistenti al congelamento, alle elevate concentrazioni saline, alla clorazione in ambiente idrico, ma meno resistenti alla permanenza in acque non clorate. La loro presenza in numero cospicuo, se accompagnata da un riscontro di Coliformi fecali, può avvalorare l'ipotesi di una contaminazione di origine fecale.

Carica batterica - Il livello di carica batterica totale è stato comunemente considerato un indicatore di qualità della pratica produttiva e conservativa. Non si può tuttavia precisare un livello unico che sia indicatore di deterioramento, o in casi particolari di

tossicità aspecifica, se non specificando il tipo d'alimento, le modalità di preparazione e di conservazione, ed altre variabili, quali il tempo trascorso dal momento della produzione. Pertanto qualunque direttiva a questo riguardo dovrebbe riferirsi a prodotti specifici, preparati in condizioni standardizzate, e dovrebbe includere un numero di u.c. sufficiente.

Limiti microbiologici

Tenendo presenti le caratteristiche microbiologiche dell'alimento e il tipo di criterio microbiologico adottato, la fissazione di limiti numerici per un alimento deve tener conto del rischio che questo può causare al consumatore, dell'influenza che i microrganismi possono avere sull'accettabilità dell'alimento, delle trasformazioni o trattamenti che esso può subire, ed infine delle caratteristiche del metodo di analisi disponibile.

In base a ciò si possono formulare limiti che possono essere diversi a seconda che si consideri una norma, una specificazione o una guideline. In particolare occorre precisare che il limite inerente ad una direttiva può essere più severo di quello inerente ad una norma, proprio per incoraggiare una migliore produzione.

I limiti usati nei criteri devono essere basati su dati microbiologici appropriati per l'alimento e devono poter essere applicabili ad una varietà di prodotti simili. Devono perciò derivare da dati ottenuti da diversi stabilimenti di produzione che operano sotto le Buone Pratiche Igieniche e che applicano il sistema HACCP.

Nello stabilire i limiti microbiologici, si deve inoltre tener conto di qualsiasi altra modifica della microflora possibile durante la conservazione e la distribuzione (p.es. diminuzione o aumento delle cariche microbiche).

I limiti microbiologici devono prendere in considerazione il pericolo associato al microrganismo ed il rischio associato alle condizioni in cui si pensa di manipolare e consumare l'alimento. I limiti microbiologici devono anche prendere in considerazione la probabilità di una dispersione non uniforme del microrganismo nell'alimento e la implicita variabilità della procedura analitica. Bisogna considerare inoltre la virulenza e la patogenicità del microrganismo: se diversi soggetti ingeriscono una dose sufficiente di tossina botulinica, tutti svilupperanno i sintomi di botulismo; viceversa con altri patogeni, solo una parte dei soggetti esposti risulterà sintomatica. La listeriosi umana è un esempio classico in cui solo una sottopopolazione abbastanza ristretta è veramente a rischio. È ovvio che in un programma di controllo è estremamente importante definire limiti in rapporto alle fasce a rischio.

È importante tenere presente infine, che nessun piano di campionamento possibile può assicurare la totale assenza di un particolare microrganismo in un lotto, e che perciò i criteri non possono garantire in maniera assoluta la sicurezza di un lotto.

Piani "a due classi" e "a tre classi" - La scelta di un piano a due o a tre classi, dipende fondamentalmente dalla pericolosità del microrganismo considerato.

Piano "a due classi" (Tab.3): fornisce un giudizio di tipo qualitativo e si applica tipicamente quando è richiesta l'assenza categorica di patogeni o di loro tossine. La ricerca si effettua su "n" unità campionarie per ognuna delle quali si pretende l'assenza completa del patogeno considerato.

Tabella 3 - Piano "a due classi"

Il piano di campionamento a "due classi" fornisce un giudizio di tipo qualitativo e si applica tipicamente quando è richiesta l'assenza categorica di patogeni o di loro tossine. La ricerca si effettua su "n" unità campionarie per ognuna delle quali si pretende la assenza completa del patogeno in questione.

esempio $n = 5$ $c = 0$ $m = 0$

I° CLASSE - CAMPIONE ACCETTABILE		□□□□□
II° CLASSE - CAMPIONE NON ACCETTABILE	es 1	■ ■ ■ ■ ■
	es 2	□ ■ ■ ■ ■
	es 3	□ □ ■ ■ ■
	es 4	□ □ □ ■ ■
	es 5	□ □ □ □ ■

□ = unità campionaria negativa per la ricerca del patogeno

■ = unità campionaria positiva per la ricerca del patogeno

Piano "a tre classi"(Tab.4): si utilizza quando la qualità del prodotto analizzato viene apprezzata con criteri di tipo quantitativo (numero di batteri presenti) e il campione analizzato si attribuisce ad una delle tre classi di giudizio distinte:

prima classe = accettabile (carica microbica inferiore a m in tutte le unità campionarie)

seconda classe = discutibile (carica microbica superiore a m solo in un numero tollerabile c di unità campionarie e comunque mai superiore a M)

terza classe = non accettabile (carica microbica superiore a M anche in una sola unità campionaria)

Tabella 4 - Piano "a tre classi"

Il piano di campionamento a "tre classi" si utilizza quando la qualità del prodotto analizzato viene apprezzata con criteri di tipo quantitativo (numero di batteri presenti) ed il campione analizzato si attribuisce ad una delle "tre classi" distinte.

I ^a CLASSE		II ^a CLASSE		III ^a CLASSE	Giudizio
accettabile	m	discutibile	M	inaccettabile	
■ ■ ■ ■ ■					Accettabile
■ ■ ■		■ ■			Accettabile
■ ■ ■		■		■	Non accettabile

m, M = limiti critici

n = numero di unità campionarie (es. = 5)

c = Numero di U.C. tollerabili tra m e M (es. = 2)

Oltre alla pericolosità del microrganismo occorre tenere conto delle condizioni cui l'alimento può essere esposto ed anche gli eventuali trattamenti che possono comportare una variazione anche notevole del numero dei microrganismi presenti e quindi del rischio. L'ICMSF nel fare una classificazione dei rischi - combinando le scale di pericolosità e rischio - considera 15 classi (Tab.5).

Il campionamento è definito da $n = x$ u.c. (numero di unità campionarie da analizzare) e da c (ove c è il numero massimo tollerabile di u.c. con caratteristiche non confacenti). Naturalmente n viene stabilito in funzione del rischio atteso per cui sarà definito da valori crescenti secondo l'incremento del rischio. Il rischio più basso è costituito da prodotti destinati alla cottura mentre tende ad aumentare sia a seconda delle modalità di conservazione dell'alimento, che possono comportare una proliferazione della carica microbica, sia a seconda del consumatore finale. Il piano può essere modulato in base a valori di n e alla quantità di prodotto (espresso in x grammi) in cui il germe va ricercato.

Tabella 5. *Piani di campionamento suggeriti in base alla severità del pericolo e delle condizioni d'uso del prodotto (es. "15 casi")*

grado di pericolosità	condizioni in cui si prevede che l'alimento venga normalmente preparato e consumato		
	Riduzione del grado di rischio	Nessuna modifica al grado di rischio	Aumento del grado di rischio
Nessun pericolo diretto per la salute (variazioni della shelf-life)	Caso 1 3-classi n=5, c=3	Caso 2 3-classi n=5, c=2	Caso 3 3-classi n=5, c=1
Pericolo per la salute basso, indiretto (indicatore)	Caso 4 3-classi n=5, c=3	Caso 5 3-classi n=5, c=2	Caso 6 3-classi n=5, c=1
moderato, diretto, limitatamente diffuso	Caso 7 3-classi n=5, c=2	Caso 8 3-classi n=5, c=1	Caso 9 3-classi n=10, c=1
moderato, diretto, potenzialmente diffusibile	Caso 10 2-classi n=5, c=0	Caso 11 2-classi n=10, c=0	Caso 12 2-classi n=20, c=0
severo, diretto	Caso 13 2-classi n=15, c=0	Caso 14 2-classi n=30, c=0	Caso 15 2-classi n=60, c=0

È logico che quanto più elevati saranno la quantità di prodotto (in grammi) ed il numero delle unità campionarie, tanto più bassi saranno i livelli di accettabilità del prodotto e quindi più rigoroso il piano. E da precisare che, mentre valori inferiori ad m sono ritenuti accettabili e valori tra m e M lo sono solo se c non oltrepassa un valore prefissato, valori superiori ad M portano al rifiuto del lotto anche se riscontrati in una sola unità campionaria.

Ovviamente la severità del piano a tre classi, oltre che dai valori critici, dipende dai due parametri n e c ed è tanto maggiore quanto più elevato è il rapporto n/c .

Quando applicabile il piano "a 3 classi" può risultare preferibile per i seguenti motivi:

- alcuni campioni possono sconfinare nella fascia di accettabilità marginale, nonostante l'applicazione delle GMP (good manufacturing practices)
- i criteri a maggiore tolleranza sono i più stabili nel tempo,
- la distribuzione dei microrganismi all'interno del lotto può essere soggetta a cambiamenti sconosciuti,
- possono essere prese misure preventive quando in epoche successive si nota un aumento dei campioni che ricadono nella fascia di marginale accettabilità.

Per quanto riguarda la scelta dei valori di m e M , valgono le seguenti considerazioni.

Nel caso di germi patogeni dannosi anche a basse concentrazioni si pone $m=0$.

Il valore M dovrebbe riflettere una cattiva pratica igienico-sanitaria e, benchè si adotti spesso $M=10m$, il rapporto tra i due valori dovrebbe essere precisato caso per caso,

tenendo conto anche della shelf-life dell'alimento e di possibili pericoli per la salute (dati epidemiologici, sperimentazione animale, dati di laboratorio).

Se m ed M sono diversi da zero è raccomandabile che tali valori vengano scelti in modo da includere l'errore del metodo nella regione di piena accettabilità o di accettabilità marginale. Le fluttuazioni nelle numerazioni sono maggiori con l'uso dei terreni liquidi arrivando fino a $\pm 0,5-1 \log_{10}$.

I criteri, pertanto, dovrebbero essere sempre riferiti a metodi specifici e tra questi si dovrebbe dare la preferenza, come già osservato, a quelli collaudati in saggi comparativi.

Quando un lotto viene rifiutato (nel piano a tre classi per superamento di M , oppure, sia nel piano "a due" che a "tre classi", per superamento di m per c/n oltre il valore prefissato) si intende, secondo alcuni esperti del settore, che esso può essere destinato, a seconda delle circostanze, sia alla distruzione, che alla eventuale riprocessazione e, talvolta, al consumo per gli animali. A volte il lotto può semplicemente essere rispedito al produttore.

Metodi di analisi

Date le implicazioni che i risultati conseguiti possono avere, è intuitivo che per una norma o standard e per una specificazione si debba far ricorso a metodi ufficiali e/o riconosciuti (elaborati da organismi internazionali quali l'ISO, la FIL/IDF, l'AOAC, la FDA, la CEE ecc.). In mancanza di questi si può ricorrere ad altri metodi "di routine" disponibili purchè almeno valutati (Tab. 6-7). Vanno sempre privilegiati i metodi che siano stati statisticamente verificati in saggi collaborativi per quanto concerne accuratezza, riproducibilità e sensibilità.

Tabella 6 - Metodi di analisi riconosciuti

1. Metodi ufficiali	Sono pubblicati su bollettini normativi sia a livello nazionale che a livello comunitario
2. Metodi di riferimento	Sono validati da organizzazioni commerciali e organismi internazionali quali ISO, AOAC, IDF, CEE, etc.
3. Metodi di routine	Sottoposti almeno a valutazione, ma differiscono da quelli di cui al punto 2 per una minore accuratezza e una maggiore "portata di analisi"

Tabella 7 - Metodi interni

Sono metodi di prova elaborati dal laboratorio e per i quali è necessario conservare tutta la documentazione: le fonti bibliografiche, le registrazioni relative alla parte sperimentale e tutto ciò che ha condotto alla formulazione del metodo.

La mancanza di metodi riconosciuti o ancora, la necessità di una risposta particolarmente rapida, permette l'utilizzo di metodiche rapide. Queste infatti sono indispensabili nel controllo di tutti quei prodotti che abbiano un ciclo commerciale così breve da rendere inutilizzabili i risultati conseguiti con i metodi classici.

Rimane fondamentale qualunque sia il metodo, il criterio di controllo a due livelli: valutazione e validazione. La valutazione: imprescindibile per qualsiasi metodo, consiste nell'accertamento che la sequenza di operazioni di un metodo analitico porti ad un risultato affidabile, cioè preciso e accurato.

La validazione, quando possibile, consiste nella verifica della precisione e dell'accuratezza di un metodo, quando viene applicato in più laboratori.

Esaminiamo rapidamente i parametri fondamentali per la valutazione di un metodo:

- accuratezza
- precisione (ripetibilità e riproducibilità)
- sensibilità
- specificità
- limite di determinazione
- praticabilità ed applicabilità

Accuratezza - Ancora oggi c'è motivo di confusione sulla definizione dell'accuratezza. Fino agli anni 40 infatti, era sinonimo di precisione; nel 1981 è stata definita come il grado di bias. Oggi è definita come il grado di concordanza fra il valore medio di un gran numero di misure ed il valore vero e viene espressa come percentuale del valore vero (Fig. 1).

L'accuratezza di un metodo è il grado di concordanza tra il valore medio di una serie di misure ed il valore "vero"
(viene espressa come percentuale del valore "vero")

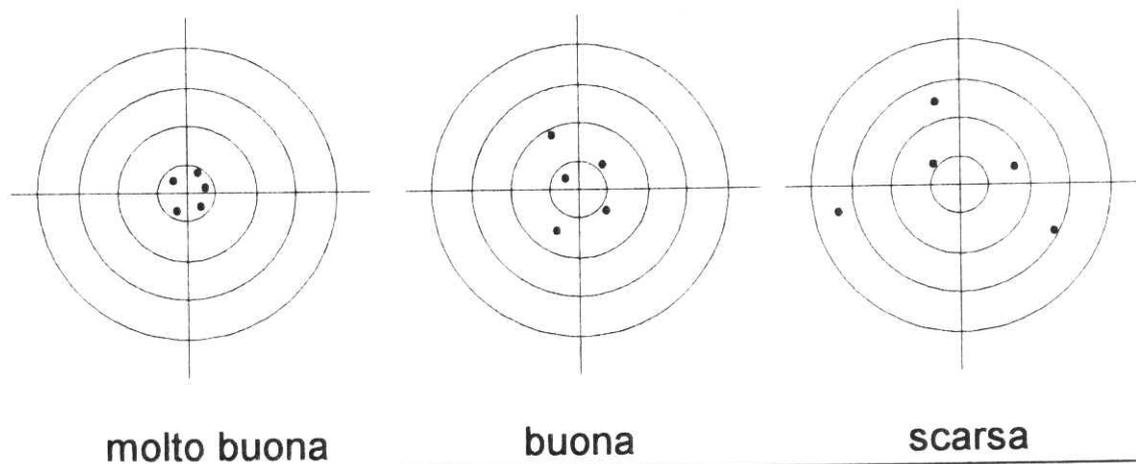


Figura 1 - Accuratezza di un metodo

La precisione di un metodo è il grado di concordanza tra i risultati ottenuti da numerose prove indipendenti sotto condizioni definite, applicando uno stesso metodo analitico, su uno stesso materiale da saggio
(Comprende i concetti di ripetibilità e riproducibilità)

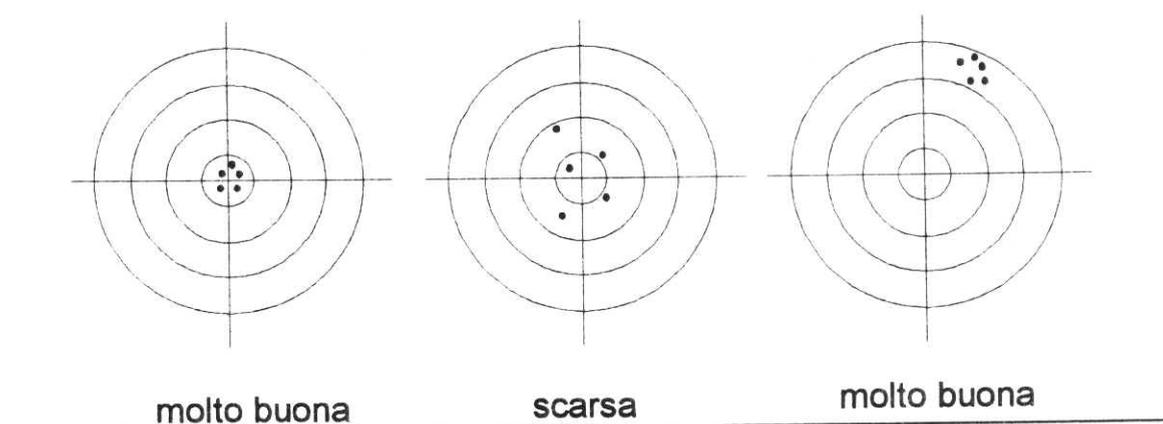


Figura 2 - Precisione di un metodo

Precisione - Un aspetto importante dei metodi microbiologici utilizzati per la numerazione dei microrganismi riguarda la precisione (Fig.2). La precisione di un metodo è il grado di concordanza tra i risultati ottenuti da numerose prove indipendenti sotto condizioni definite, applicando uno stesso metodo analitico, su uno stesso materiale da saggio (Comprende i concetti di ripetibilità e riproducibilità).

Il calcolo dell'indice MPN rappresenta il sistema comunemente seguito per l'interpretazione numerica dei risultati della ricerca dei coliformi mediante semina in tubi da fermentazione. Il sistema ha valore generale e può essere utilizzato per la numerazione di vari microrganismi in terreno liquido, purchè si abbia la certezza di lavorare con popolazioni microbiche pure oppure, in alternativa, a condizione di impiegare mezzi di coltura selettivi.

Secondo De Man, l'autore delle tabelle attualmente utilizzate, esistono combinazioni statisticamente inaccettabili ed altre poco probabili, queste ultime da non considerare nel caso si debbano prendere delle decisioni importanti. Va ricordato che le tabelle del MPN sono il risultato di un calcolo matematico-statistico e pertanto esse forniscono valori medi nell'ambito di un'oscillazione più o meno ampia, a seconda del grado di probabilità prefissato. Per questa ragione è più corretto accompagnare i valori letti sulle tabelle con i corrispondenti limiti fiduciali calcolati al 95% o al 99% di probabilità. Risulta così che nel caso dei conteggi con le serie di tre provette, i limiti di confidenza coprono un intervallo tale che il rapporto tra il valore più alto e quello più basso può essere di oltre 10 volte. Il limite inferiore ed il limite superiore indicano i valori entro i quali ci si può attendere con una probabilità fiduciaria del 95% e del 99% che sia compresa la densità reale del campione.

Nel caso della numerazione in terreno solido, tralasciando tutte le influenze esercitate dallo shock termico subito dall'inoculo, dall'effetto dei componenti del terreno sulla vitalità della popolazione dell'inoculo etc., è stato dimostrato che le conte in piastra si distribuiscono secondo le serie di Poisson. Si è perciò concluso che maggiore è il numero delle colonie contate, maggiore è la precisione del metodo sul piano statistico. Per questo, con tutte le limitazioni imposte dalla reale possibilità di distinguere chiaramente le singole colonie e dalla loro confluenza od inibizione reciproca, l'intervallo preferenziale entro il quale dovrebbero cadere i conteggi delle piastre valide dovrebbe essere compreso tra 80 e 320 e non tra 30 e 300 unità.

Alla luce di questi e di altri studi sui fattori che influenzano la precisione dei conteggi, l'ICMSF ritiene accettabile per i conteggi in terreno liquido una variazione di $\pm 1 \log_{10}$ e per quelli in terreno solido $\pm 0,5 \log_{10}$.

Specificità - E' l'attitudine a rilevare correttamente il parametro ricercato, in presenza di fattori interferenti, ed è inversamente proporzionale al numero di falsi positivi. Come abbiamo visto, il controllo di un alimento può avere il solo scopo di rivelare la presenza di specifici microrganismi oppure quello di quantificarne il più esattamente possibile la presenza nell'unità di volume (ml) o di peso (g) del campione in esame.

Nel primo caso, per esempio, per la ricerca delle salmonelle o del *C.botulinum* si tiene conto del fatto che la presenza di questi patogeni è minoritaria rispetto a tutti gli altri microrganismi contaminanti il prodotto.

Si eseguono perciò tecniche di arricchimento selettivo del patogeno ricercato, utilizzando brodi selettivi e condizioni d'incubazione che favoriscano lo sviluppo del patogeno cercato e penalizzino lo sviluppo di tutti gli altri microrganismi. L'eventuale presenza del patogeno nel brodo di arricchimento selettivo viene rivelata trasferendo un'ansata del brodo stesso su terreni selettivi e differenziati. La specificità del metodo microbiologico è quindi raggiunta dall'impiego di terreni selettivi e condizioni di incubazione particolari e può essere verificata con ceppi di riferimento da utilizzare come controlli positivi e negativi. Tuttavia l'identificazione finale del microrganismo è raggiunta in genere, con una serie di prove biochimiche la cui interpretazione complessiva permette l'identificazione e la conferma del microrganismo. Tutta la serie finale di prove (generalmente miniaturizzate) viene considerata "la fase di conferma".

Data l'importanza della conferma delle colture "sospette" si utilizzano usualmente più prove di identificazione: da un minimo di 2 (coagulasi e termonucleasi) nel caso di *S.aureus* ad una decina o più come nel caso delle salmonelle o della *Listeria monocytogenes*. Nel caso delle salmonelle poi, si associa alla conferma mediante prove biochimiche, quella mediante prove sierologiche con antisieri polivalenti specifici.

Praticabilità - I metodi devono essere fattibili quindi devono utilizzare reagenti e attrezzature commercialmente disponibili.

I metodi da seguire vanno raccolti e documentati per iscritto secondo lo schema ISO/TC 34 n. 7667 descrivendo quindi:

- 0.1 titolo
- 0.2 introduzione
- 0.3 precauzioni di sicurezza
- 1 scopo e campo di applicazione
- 2 riferimenti
- 3 definizioni
- 4 principio e reazioni
- 5 diluenti, terreni di coltura e altri prodotti
- 6 apparecchiature e vetreria
- 7 campionamento
- 8 preparazione del campione per l'analisi
- 9 procedimento
- 10 espressione dei risultati
- 11 precisione
- 12 registrazione delle prove

È il caso di prevedere anche indicazioni esaurienti per il controllo di qualità, così tutte le informazioni aggiuntive eventualmente necessarie all'operatore.

È importante nella selezione dei metodi, considerare l'orientamento attuale verso metodi orizzontali, cioè metodi nel cui campo di applicazione rientri il maggior numero possibile di matrici.

Controllo di qualità di un metodo analitico

Questa fase comprende tutte quelle operazioni attraverso cui mantenere risultati ad un predeterminato livello di qualità. Il monitoraggio delle prestazioni del laboratorio nel tempo è una delle condizioni fondamentali per l'ottenimento della qualità.

Possono risultare utili:

- determinazioni analitiche replicate
- controlli positivi
- controlli negativi
- impiego di ceppi di riferimento e/o materiali standard di laboratorio

Per quanto riguarda i metodi di routine, quando questi siano basati su metodi "commerciali" (ELISA, LACTECK, etc...) accuratezza, precisione, specificità, dovrebbero essere forniti dal produttore.

Registrazione di un metodo analitico

La metodologia prescelta deve essere approvata dalla direzione del laboratorio, di concerto con il responsabile del PAQ e il direttore del settore. Il responsabile del settore deve garantire la sua corretta applicazione senza varianti.

Ogni eventuale revisione del metodo deve essere registrata insieme alla descrizione di qualunque azione correttiva effettuata.

VALUTAZIONE DEL RISCHIO MICROBIOLOGICO

Giovanna Franciosa

Laboratorio Alimenti - Istituto Superiore di Sanità

Il concetto di “qualità” è strettamente correlato a quello di “sicurezza”. Un processo qualsiasi è sicuro quando i rischi ad esso associati vengono giudicati accettabili.

Così, un alimento viene considerato “di buona qualità”, cioè di sicuro uso, quando non presenta rischi per la salute pubblica.

In generale, il rischio è la misura della probabilità di accadimento di un evento pericoloso per la salute umana, animale, vegetale e/o ambientale. Fra gli elementi del rischio vi sono le sue caratteristiche intrinseche, il tasso di esposizione, la frequenza di accadimento. La misura del rischio è, perciò, oggettiva, anche se probabilistica: tutte le stime di rischio contengono, infatti, un grado di incertezza dovuto fondamentalmente all'assenza od incompletezza di informazioni scientifiche.

La sicurezza è un giudizio sull'accettabilità di un processo associato ad un certo rischio. Tale giudizio è, come tale, soggettivo, basato, cioè, su valori personali, sociali ed anche economici.

Ne consegue che mentre il rischio è una grandezza scientificamente misurabile, la sicurezza non lo è. Così, mentre il livello di un rischio può rimanere lo stesso, la tollerabilità di quel rischio è soggetta a mutamenti: per esempio, l'ossido di etilene, sostanza ammessa fino a pochi anni fa a livelli di 50 ppm, è oggi tollerata a livelli inferiori ad 1 ppm

Questo tipo di approccio è di più difficile attuazione in microbiologia, poiché i microrganismi viventi presentano rischi spesso imprevedibili, non essendo così strettamente regolati dalle leggi della fisica come lo sono le reazioni chimiche.

La sicurezza in un laboratorio biologico preposto al controllo ufficiale degli alimenti (così come in altri laboratori di controllo e ricerca) è fondamentale per due ragioni:

- 1) ogni pratica di laboratorio comporta un certo grado di rischio. Occorre determinare l'entità del rischio e stabilire a priori quali possano essere gli effetti sia sull'esperimento che sullo sperimentatore e sulla comunità.
- 2) esaminare la sicurezza permette di pianificare la riduzione del rischio e di ricercare metodi alternativi per raggiungere gli stessi fini minimizzando il rischio stesso. La “valutazione del rischio” rientra nel primo punto. La valutazione del rischio microbiologico è una valutazione scientifica sugli effetti avversi per la salute (noti o potenziali) derivanti dall'esposizione ad agenti patogeni (batteri, virus, funghi, lieviti, elminti, alghe unicellulari, ed eventuali prodotti tossici elaborati da questi microrganismi). Fornisce una stima della probabilità di esposizione all'agente patogeno e della severità dell'evento. Nel laboratorio di analisi microbiologiche degli alimenti devono essere valutati il rischio microbiologico per l'operatore (derivante dal contatto con i patogeni alimentari), per la comunità (derivante dalla fuoriuscita accidentale dei patogeni alimentari da quella “nicchia ecologica” che è il laboratorio all'ambiente esterno) e per l'esperimento (dovuto alla possibilità di contaminazioni durante la

procedura sperimentale). In tutti i casi, la valutazione del rischio microbiologico consta delle stesse quattro fasi:

- identificazione del patogeno alimentare
- caratterizzazione del patogeno alimentare
- esposizione
- caratterizzazione del rischio

Valutazione del rischio microbiologico per l'operatore

Identificazione del patogeno alimentare - E' un'indicazione qualitativa dell'agente patogeno alimentare e dei danni che esso può causare alla salute umana.

I laboratori di microbiologia son ambienti di lavoro speciali, spesso unici, che pongono rischi di malattie infettive relativamente identificabili.

Tuttavia, il rischio reale è difficile da definire poichè, fino a poco tempo fa, non esisteva alcun sistematico metodo di rilevazione per il monitoraggio delle malattie contratte in laboratorio (oggi è l'ISPESL, in base al D. L.vo 626/94, che si occupa di questa materia). I dati di sorveglianza su questo tipo di malattie sono comunque di difficile raccolta perchè spesso si tratta di infezioni subcliniche, il periodo di incubazione può essere atipico, ed inoltre frequentemente non vengono riportate, per paura o imbarazzo.

Dai pochi reports che esistono in letteratura su questo argomento, risulta comunque evidente che gli operatori che lavorano in quegli ambienti particolari che sono i laboratori di microbiologia sono una popolazione ad alto rischio di infezione dai patogeni con i quali lavorano, rispetto al resto della popolazione; sempre dalla letteratura, si evince, invece, che i casi di infezione secondaria, per es. tra i parenti di questi operatori, sono rari. In Tab.1 e 2 sono riportati i casi di tossinfezione alimentare contratti in laboratorio estrapolati dalla letteratura.

Tabella 1 - *Infezioni acquisite in laboratorio*

TIPO DI MICRORGANISMO	%
batteri	42.5
virus	26.7
rickettsiae	14.6
funghi	9.0
chlamidiae	3.3
parassiti	2.9
aspecifiche	0.9

Tabella 2 - Infezioni da patogeni alimentari acquisite in laboratorio

INFEZIONE	CASI NEL MONDO
Brucellosi	423
Salmonellosi	11
Shigellosi	26
Colera	3
Botulismo	1
Gastroenterite da <i>Campylobacter</i>	3

Nella prima fase della valutazione del rischio, i laboratoristi devono, perciò, confidare sulle informazioni disponibili: singoli case-reports, ma soprattutto la conoscenza dei meccanismi di patogenicità e virulenza dei microrganismi e delle loro modalità di trasmissione.

Molti patogeni alimentari sono noti (virus, batteri, protozoi, alghe unicellulari, lieviti, muffe, parassiti). Un alimento contaminato che arriva in un laboratorio può essere veicolo di malattie infettive (brucellosi, colera, TBC); parassitosi (amebiasi, teniasi, trichinosi, echinococcosi); causare infezioni (la massiva moltiplicazione microbica permette il raggiungimento di cariche che hanno il sopravvento sui meccanismi di difesa dell'ospite) o intossicazioni, attraverso l'elaborazione di tossine.

Sebbene le conoscenze nel campo della microbiologia alimentare siano vaste, vi è, tuttavia, la possibilità che alcuni microrganismi patogeni alimentari non siano stati ancora identificati (si pensi, ad es., ai patogeni emergenti, il cui ruolo è stato riconosciuto solo recentemente).

Inoltre è necessario tenere in considerazione anche i fenomeni allergici, dovuti ad ipersensibilità individuale ai microrganismi o ai loro prodotti metabolici.

C'è, quindi, da sottolineare che, comunque, una valutazione del rischio oggettiva non dovrebbe essere focalizzata sui singoli agenti patogeni, ma sulle pratiche standard che si intendono eseguire in laboratorio, al fine di prevenire la trasmissione di tutti gli agenti patogeni.

Caratterizzazione del patogeno alimentare - Questa è un'indicazione quantitativa degli effetti avversi per la salute causati dall'eventuale esposizione all'agente patogeno alimentare.

Lo scopo di questa fase, è quello di fornire una stima della quantità di agente patogeno necessaria a causare la malattia. Per la valutazione del rischio chimico, questi dati si ottengono in base a stime di dose-risposta . Mentre questo stesso tipo di stima viene utilizzato per le tossine prodotte dai microrganismi, nel caso degli agenti patogeni infettivi si tratta di stabilirne la minima dose infettiva. Per molti patogeni alimentari questi dati sono limitati o non esistono affatto. Inoltre, sono dati che dipendono da una serie di

variabili, tra le quali: virulenza/patogenicità del microrganismo, suscettibilità dell'ospite (che a sua volta dipende dall'età, sesso, razza, stati di gravidanza), difese immunitarie, via di trasmissione, ecc.

Esposizione - E' la determinazione qualitativa e quantitativa della probabilità di contatto con l'agente patogeno alimentare.

In generale, in un laboratorio di microbiologia le quantità di materiale infettivo sono elevate. I microrganismi vengono coltivati in condizioni ideali di crescita e, potenzialmente in ogni fase dell'esperimento, dall'apertura dell'alimento da analizzare allo scarto finale delle colture ottenute dall'alimento di partenza, l'analista può entrare in contatto con i patogeni eventualmente presenti nell'alimento e successivamente posti in coltura.

Le modalità più frequenti di trasmissione di patogeni alimentari in laboratorio riportate in letteratura sono le seguenti: ingestione accidentale (per es., attraverso la pratica erronea del pipettaggio per aspirazione orale); inalazione di aerosol o schizzi (per es., provocati dall'uso improprio di apparecchi quali sonicatori, vortex, etc.); l'inoculazione, attraverso l'uso di aghi, siringhe; penetrazione della pelle o delle mucose (attraverso tagli procurati da vetri rotti od oggetti acuminati); trasmissione mediata da vettori animali o ectoparassiti.

Le condizioni ambientali che possono favorire la trasmissione dei patogeni nell'ambiente del laboratorio vanno da una cattiva ventilazione (improvvisate correnti d'aria, impianto di condizionamento inadeguato), all'affollamento (sia di personale che di apparecchiature), al tipo di attrezzature, a possibili infestazioni da insetti o roditori.

Caratterizzazione finale del rischio - La caratterizzazione finale del rischio deriva dall'integrazione delle fasi precedenti, allo scopo di stimare il rischio di malattia per un microbiologo esposto ai pericoli sopra menzionati. Il fine ultimo di questa fase è quello di sviluppare modelli probabilistici per determinare la possibilità che un rischio microbiologico si verifichi, tenendo conto dei gradi di incertezza.

Senza entrare nel merito dei metodi di statistica, è sufficiente il buon senso per stabilire che in un laboratorio preposto alle analisi microbiologiche degli alimenti, il rischio microbiologico per l'operatore è reale e, in una certa misura, individuabile.

Per la sicurezza del personale che lavora in laboratorio, è necessario stabilire quanto questi rischi siano accettabili. I criteri di giudizio sull'accettabilità dei rischi in laboratorio sono definiti dalla legge (in particolare il D. L. vo 626/94).

Tuttavia, è un buon esercizio anche utilizzare, giorno per giorno, alcuni criteri basati sul "buon senso", per es. considerando:

- 1) La consuetudine d'uso di una pratica.
- 2) In linea di massima, se una certa procedura è stata utilizzata in laboratorio per lungo tempo, essa è sicura, altrimenti sarebbero emersi i suoi difetti e sarebbe già stata abbandonata. Tuttavia, ciò non è sempre vero: per es. il pipettaggio a bocca è una pratica che ancora viene utilizzata in laboratorio, ma che non è sicura. Le nuove tecnologie pongono nuovi ed incogniti problemi, a tale proposito.

- 3) Il rapporto necessità / benefici. E' ingiustificabile affrontare rischi consapevolmente in laboratorio, sulla base dei benefici che ne derivano. Dobbiamo sempre chiederci: è questo procedimento necessario? Esiste un'alternativa più sicura? In laboratorio, è necessario scegliere sempre la procedura sperimentale migliore a disposizione, cioè quella che offra il maggior livello di protezione e la minore possibilità di esposizione ai rischi.

Sulla base della caratterizzazione del rischio, si sviluppa la cosiddetta "gestione" del rischio, atta a determinare azioni che riducano il rischio, al fine di renderlo accettabile.

Tra le misure di controllo atte al contenimento del rischio microbiologico per l'operatore, particolare importanza hanno:

- le buone pratiche di laboratorio: a questo proposito è molto importante l'addestramento del personale, attraverso corsi, documentazione varia, ecc.
- le linee guida (legge 626; manuali vari esistenti sull'argomento)
- l'equipaggiamento di sicurezza, con particolare riguardo ai livelli di biosicurezza, cioè a quelle specifiche classi di rischio nelle quali vengono classificati gli agenti infettivi in base alle caratteristiche di virulenza e patogenicità, conseguenze dell'infezione, potenziale epidemico, dose minima infettiva, modalità di trasmissione, spettro degli ospiti (inclusi riserve e vettori animali) ed, infine, sopravvivenza nell'ambiente di laboratorio
- l'immunoprofilassi: in Italia non esiste alcun obbligo di vaccinazione per il personale di laboratorio, ed il tutto è rimesso alla volontà individuale

Rischio microbiologico per la comunità

In questo caso si tratta del rischio dovuto al rilascio accidentale dei patogeni alimentari nell'ambiente.

La valutazione di questo tipo di rischio microbiologico si basa sulle stesse quattro fasi precedentemente discusse. Differisce l'esposizione della popolazione al rischio di contatto con i patogeni alimentari.

Il personale che lavora in laboratorio ha l'obbligo di proteggere se stesso, ma ha altrettanto il dovere di proteggere il resto della comunità, prevenendo la contaminazione ambientale.

Particolare attenzione deve essere posta, quindi, nello smaltimento dei rifiuti (sterilizzazione ed incenerimento del materiale infetto monouso); nella salvaguardia della rete idrica (è inammissibile lo scarto delle colture microbiche nel lavandino); nei sistemi di areazione che, preferibilmente, dovrebbero essere meccanici, in modo da assicurare flussi di aria in entrata; nella spedizione dei ceppi patogeni da un laboratorio all'altro (in contenitori metallici ermeticamente chiusi e confezionati in pacchetti opportunamente etichettati).

Rischio microbiologico per l'esperimento

In questo caso, il fine è quello di valutare se durante l'esecuzione di un'analisi microbiologica di un alimento possa intervenire una cross-contaminazione microbica. E'

un rischio microbiologico, quindi, che non ha effetti diretti sulla salute umana, ma che potrebbe influire negativamente sui risultati dell'analisi (per es. dando luogo a risultati falsi positivi), con chiare conseguenze anche sulla qualità del controllo.

La valutazione di questo tipo di rischio prevede le stesse fasi descritte precedentemente.

Tra i metodi per ridurre i rischi di cross-contaminazione microbica in laboratorio, fondamentale importanza hanno la conservazione appropriata dei campioni da analizzare e dei ceppi di collezione (possibilmente, in ambienti fisicamente separati); l'uso regolare di materiali sterili, la disinfezione frequente del bancone e degli strumenti. In altre parole, è necessaria ancora una volta l'applicazione delle buone pratiche di laboratorio.

Il rischio microbiologico e il sistema HACCP

I concetti fin qui espressi sulla valutazione del rischio microbiologico e sulle diverse fasi che lo compongono sono gli stessi definiti da vari Codex Alimentarius ed utilizzati nella valutazione del rischio come anello iniziale del sistema HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point). Questo è un approccio sistematico di tipo preventivo atto ad identificare i punti critici di un processo che devono essere tenuti sotto stretto controllo per assicurare la qualità del prodotto finale. Si applica, generalmente, per prevenire problemi legati alla sicurezza degli alimenti, dalle materie prime, alla manifattura, conservazione, distribuzione e consumo finale del prodotto alimentare.

La valutazione del rischio, ad es. di quello microbiologico, fa parte della prima fase di questo sistema (hazard analysis). Successivamente, vengono individuati e localizzati i vari punti del processo sui quali può essere esercitato un controllo per prevenire, eliminare o minimizzare un certo pericolo.

La valutazione del rischio microbiologico è un processo difficoltoso, nello svolgimento di un programma HACCP; i gradi di incertezza relativi alle quattro fasi sono molto numerosi (ad es., si tratta di predire la risposta dei microrganismi ai vari trattamenti che subisce un alimento), ed inoltre i criteri di accettabilità sono tuttora oggetto di discussione.

Sebbene la trattazione del sistema HACCP esuli dall'argomento del corso, c'è da sottolineare l'unicità del concetto di valutazione del rischio microbiologico.

Infatti, è stato recentemente proposto da esperti della "biosicurezza" che questo approccio di tipo preventivo venga utilizzato anche nei laboratori (disciplina che va sotto il nome di "Job Safety Analysis"): nella pratica, si tratta di disegnare tutte le varie fasi di un procedimento sperimentale, valutare il rischio potenziale relativo a ciascuna fase, e sviluppare soluzioni preventive.

Può essere utilizzato sia per pianificare nuove procedure sperimentali, che per evidenziare i rischi microbiologici associati a procedure sperimentali già ben stabilite.

Conclusioni

Il rischio microbiologico in un laboratorio biologico per il controllo ufficiale degli alimenti dipende dalle manipolazioni con l'agente patogeno, dal tipo di agente patogeno e dall'esperienza del laboratorista. A questo proposito, è da rilevare che il livello

professionale degli operatori di questo settore è buono e che le conoscenze non mancano. Sebbene la percezione del rischio, che è influenzata da caratteristiche individuali, psico-sociali e da input esterni, giochi anch'essa un ruolo importante (alcuni pensano di essere invulnerabili in laboratorio, altri sono fin troppo sensibili a rischi anche insignificanti), l'attuazione delle conoscenze in questo campo su basi razionali non può che aiutare a lavorare in un ambiente più sicuro, e, come tale, migliore.

BIBLIOGRAFIA

- Bernard D. T., Scott V. N. 1995. "Risk assessment and foodborne micro-organisms: the difficulties of biological diversity" *Food Control* 6 (6) : 329-333
- Favero M. S. 1987. "Biological hazards in the laboratory" *Laboratory Medicine*, 18 (10) : 665-670
- McKone T. E. 1996. "Overview of the risk analysis approach and terminology: the merging of science, judgment and values" *Food Control* 7(2) : 69-76
- Pike R.M. 1979. "Laboratory-associated infections: incidence, fatalities, causes, and prevention" *Ann. Rev. Microbiol.* 33 : 41-66.
- Rapporti ISTISAN. 1996. "Linee guida per l'assicurazione della qualità nei laboratori preposti al controllo ufficiale dei prodotti alimentari".
- Sewell D. L. 1995. "Laboratory-associated infections and biosafety" *Clin. Microbiol. Rev.* 8(3) : 389-405
- Songer J.R. 1995. "Laboratory safety management and the assessment of risk" p 257-268. In D. O. Fleming, J. H. Richardson, J. I. Tulis e D. Vesley (ed), *Laboratory Safety: principles and practices*, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- U.S. Department of Health and Human Services. 1993. "Biosafety in microbiological and biomedical laboratories." CDC 93-8395. U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- WHO "Manuale di biosicurezza in laboratorio" ed. Italiana pubblicata negli *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*. Suppl. al n.2, vol. 31, 1995
- WHO. "Application of risk analysis to food standards issues". Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation. WHO/FNU/FOS/95.3. 1995
- WHO. "Risk analysis in codex work" FAO/WHO Food Standards Program. CX/EXEC96/43/6. 1996