

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Alimentari

Il concetto di qualità nei terreni colturali in microbiologia alimentare

Relatore

Ch. mo Prof. Alessio Giacomini

Correlatore

Dott. ssa Maria Grimaldi

Laureando

Bergo Tiziano

Matricola n. 616212-STL

ANNO ACCADEMICO 2012 – 2013

Dedicato alla mia famiglia...

Indice

Riassunto	pg 0
Abstract	pg 1
1 Introduzione	
1.1 Scopo dell'elaborato finale	pg 3
1.2 Terreni colturali: un po' di storia.....	pg 3
1.3 Composizione dei terreni colturali.....	pg 5
1.4 Tipologie dei terreni colturali.....	pg 9
2 Sistemi di Gestione per la Qualità	
2.1 Il concetto di qualità e la sua evoluzione nel tempo.....	pg 12
2.2 I principi del Sistema di Gestione per la Qualità (SGQ).....	pg 15
2.3 ISO 9001:2008.....	pg 16
3 Processo di produzione terreni colturali	
3.1 Descrizione del flow-chart di produzione.....	pg 20
4 Controllo Qualità	
4.1 Ceppi di riferimento.....	pg 26
4.2 Controllo di Qualità nei terreni colturali.....	pg 27
4.2.1 Qualità dei parametri chimico-fisici.....	pg 28
4.2.2 Qualità microbiologica.....	pg 29
4.3 Caso di studio.....	pg 31
5 Conclusione.....	pg 37
Bibliografia.....	pg 42
Sitografia.....	pg 43

Riassunto

I terreni colturali o mezzi di crescita sono una formulazione di sostanze naturali o sintetiche necessarie per la moltiplicazione dei microrganismi.

In questo elaborato finale vengono approfonditi gli aspetti riguardanti la qualità dei terreni colturali, con particolare riferimento all'attuazione del sistema di gestione e controllo della qualità, che assicura la conformità dei mezzi di crescita in funzione ai requisiti qualitativi stabiliti dalle disposizioni normative vigenti.

Il primo capitolo inizia con un breve accenno alla storia dei terreni colturali, dove vengono evidenziate le principali tappe storiche che ne hanno portato all'ideazione. Il capitolo si conclude con la descrizione delle principali componenti presenti nella formulazione dei terreni colturali, mentre nell'ultimo paragrafo verrà trattata la classificazione dei mezzi di crescita secondo la normativa UNI EN ISO 11133-1 del 2009.

Nel secondo capitolo viene descritto il concetto di qualità, a partire dalla sua nascita fino ad evidenziare quali sono i requisiti principali che l'azienda deve rispettare per implementare un sistema di gestione della qualità, soffermandosi in particolar modo sui requisiti richiesti dalle normative ISO della serie 9000, mentre il terzo e quarto capitolo dell'elaborato finale sono il fulcro dell'elaborato stesso, inizialmente viene descritto in maniera approfondita il metodo di produzione dei terreni colturali, dopodiché vengono definiti che cosa sono e quali sono, i controlli qualitativi standard effettuati sui terreni colturali evidenziandone le caratteristiche peculiari e l'effettiva utilità in un laboratorio di microbiologia.

Per capire la relativa efficacia ed efficienza di un sistema di gestione fondato sulla qualità dei terreni colturali viene analizzato un caso studio di un laboratorio pubblico accreditato. Il caso coinvolge gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali, i quali hanno condotto delle ricerche sullo studio della shelf-life che diventa un indice di valutazione del livello qualitativo dei mezzi di crescita e della qualità del processo produttivo con la quale i terreni colturali sono stati ottenuti.

Nell'ultimo capitolo dell'elaborato finale viene evidenziato l'andamento delle certificazioni e degli accreditamenti in Italia negli ultimi dieci anni, concludendo con una breve descrizione dei costi che l'azienda sostiene per l'accreditamento.

Abstract

The culture media or growth media are a formulation of natural or synthetic substances necessary for the multiplication of microorganisms.

In this dissertation are detailed the aspects of the quality of culture media, particularly the implementation of the management system and quality control, which ensures the conformity of growth media according to the quality requirements set by regulations in force.

The first chapter begins with a brief reference to the history of culture media, which highlights the main historical stages that have led to the creation. The chapter concludes with a description of the main components that make up the growth media, while in the last paragraph will be treated their classification according to the UNI EN ISO 11133-1:2009.

In the second chapter are discussed what is meant by the concept of quality, starting with the description from his birth to highlight how to apply, operate a system of quality management in a company, focusing particularly in the requirements of the ISO 9000 series, while the third and fourth chapters of this dissertation are the core of this dissertation itself, is initially exposed in detail the method of production of the culture media and then are defined what they are and what are the quality control standard made in the culture media, highlighting the characteristics and usefulness in a microbiology laboratory.

To understand the relative effectiveness and efficiency of a management system based on the quality of the culture media to analyze a case of study of a public accredited laboratory. The case involves the Zooprohylactic Institute, which have conducted research on the study of the shelf-life that becomes an index of evaluation of the quality level of the growth medium and the quality of the production process by which it was obtained.

In the last chapter of this dissertation is shown the performance of the certifications and accreditations in Italy over the last ten years ending with a brief description of the costs which the company claims for the accreditation.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Scopo dell'elaborato finale

I terreni colturali al giorno d'oggi sono uno strumento diagnostico indispensabile per numerose analisi microbiologiche standardizzate e validate da enti di normazione a livello internazionale.

Diventa quindi fondamentale implementare un sistema di gestione e controllo, che garantisca la conformità dei terreni colturali a requisiti e caratteristiche qualitative accettabili, previste dalle disposizioni normative vigenti in materia di qualità.

1.2 Terreni colturali: un po' di storia

In questo paragrafo illustrerò quali sono state le tappe principali che hanno portato all'ottenimento dei terreni colturali, uno strumento dal semplice utilizzo e dalla grande utilità per la ricerca.

Era l'anno 1819 quando a Legnaro un paese del padovano, la famiglia Pittarello notò che la polenta e le scorte alimentari conservate da giorni in casa si ricoprirono di macchie di color rosso-sangue.

Lo sviluppo delle macchie continuò per giorni, tanto che nemmeno l'intervento dell'Arciprete di Padova per "esorcizzare" le derrate alimentari, fu efficace per impedire la totale ricoperta degli alimenti.

Il caso religioso era inevitabile, tanto che le autorità dell'epoca diedero vita ad un'apposita commissione per lo studio del fenomeno, ma arrivarono alla conclusione che il caso della "polenta rossa" fosse solo un semplice fatto naturale.

Chi diede un contributo concreto per chiarire la natura del fenomeno fu Bartolomeo Bizio un chimico-farmacista che studiò lo sviluppo delle "macchie rosse" usando del pane e della polenta.

Alla fine dei suoi studi Bizio giunse alla conclusione che la causa era imputabile ad un "vegetabile", un nuovo fungo senza gambo che chiamò *Serratia marcescens*.

In realtà il brillante farmacista non isolò un fungo, ma molti anni più tardi si scoprì essere un batterio gram-negativo appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* cioè la specie *Serratia marcescens*.

Quello che fece Bizio in quegli'anni possiamo definirlo come un primo tentativo di isolamento ed identificazione batterica su terreno colturale naturale, anche se per parlare di veri e propri terreni di coltura si deve aspettare ben quarantasei anni dopo.

Nel 1865 due furono i personaggi determinanti nella storia dei terreni colturali, il primo fu Louis Pasteur che con i suoi studi sulle cinetiche di fermentazione dei microrganismi nel mosto d'uva e, le ricerche sulle alterazioni

microbiche del vino lo portarono a suddividere i batteri in base alle loro capacità metaboliche nei differenti substrati di crescita naturali impiegati nelle sue analisi, mentre il secondo personaggio importante fu Robert Koch che nel 1865 notò che nel sangue animale e nei brodi di carne i microrganismi avevano quasi tutti gli elementi nutritivi necessari per svilupparsi in modo considerevole, ma il problema che rimaneva era l'isolamento, l'identificazione e la differenziazione dei microrganismi dal brodo colturale.

Così Koch nel 1881 cercò di risolvere il problema creando il primo terreno colturale solido della storia infatti non fece altro che aggiungere la gelatina al brodo di carne ottenendo così una "gelatina nutritiva" che veniva versata su dei piatti tesi in vetro riposti all'interno di una campana sempre del medesimo materiale. La gelatina nutritiva di per sé possiede delle buone proprietà gelificanti, ma se impiegata nei terreni colturali ha delle caratteristiche tecnologiche inaccettabili, infatti i principali difetti sono:

- ✚ se si deve incubare il terreno colturale ad alte temperature (oltre i +45°C) la gelatina tornava allo stato liquido.
- ✚ molte specie microbiche producono le gelatinasi cioè enzimi in grado di degradare la gelatina portando così il terreno colturale alla liquefazione.

Esattamente un anno dopo nel 1882 l'utilizzo del primo agente gelificante nei terreni colturali, una casalinga Fannie Hesse suggerì al marito Walther che lavorava presso i laboratori del dottor Koch, di sostituire la gelatina con l'agar dato che lo impiegava già per preparare budini e gelatine alla frutta in casa.

Il risultato fu sorprendente date le peculiarità del nuovo agente gelificante che non mise molto a rimpiazzare la gelatina in ambito microbiologico.

Risolto il problema dell'agente gelificante non restava che creare un supporto adeguato dove contenere i terreni colturali e nel 1887 il Dottor Julius Richard Petri creò due sub-unità compenetranti in vetro, di forma cilindrica (di cui un lato è aperto) di 14 millimetri d'altezza e 90 millimetri di diametro dando vita alle omonime piastre, tutt'oggi utilizzate in ambito laboratoristico impiegando però materiali plastici come sostitutivi del vetro.

Fu nel 1890 che venne coniato il termine terreni colturali per microrganismi, ma la classificazione dell'epoca non comprendeva ancora i terreni colturali selettivi e/o differenziali che furono creati una decina di anni più tardi, infatti tra il 1900 e il 1905 fu creato il primo terreno colturale selettivo dove venivano impiegati composti a base di arsenico e coloranti, per selezionare i microrganismi d'interesse.

Nella storia dell'utilizzo degli agenti selettivi nei terreni colturali l'anno 1960 riveste un ruolo di fondamentale importanza perché furono introdotti dei nuovi agenti selettivi e cioè gli antibiotici (come ad esempio la penicillina), rivoluzionando così il metodo per la selezione dei microrganismi nei terreni colturali.

Per parlare di terreni colturali differenziali si deve attendere fino al 1919 quando il microbiologo americano James Brown usò il sangue bovino agarizzato

per studiare le reazioni emolitiche dei microrganismi appartenenti al genere *Streptococcus*.

Dagli anni '20 ad oggi molte cose sono cambiate infatti la produzione dei terreni colturali a livello industriale, l'evoluzione delle tecniche di preparazione delle componenti, l'impiego di materie prime di qualità e l'introduzione di nuovi metodi di conservazione dei terreni colturali hanno permesso di migliorare la qualità nutrizionale del prodotto e le sue caratteristiche funzionali (isolamento, identificazione presuntiva e conservazione dei microrganismi) rendendolo uno strumento d'analisi versatile, affidabile ed all'avanguardia.

1.3 Composizione dei terreni colturali

Le varie componenti del mezzo di crescita possono essere raggruppati in base a due aspetti 1) Nutrizionale e 2) Tecnologico, ma alcune di queste componenti hanno più di una funzionalità e quindi compaiono in più categorie:

Aspetti nutrizionali

Fonti di energia e di carbonio: I carboidrati vengono aggiunti ai terreni colturali come fonte primaria di energia e di carbonio per i microrganismi. I principali carboidrati aggiunti nei mezzi di crescita sono generalmente monosaccaridi (glucosio, fruttosio ed altri) cioè zuccheri semplici prontamente utilizzabili dal microrganismo, in casi particolari troviamo nei terreni colturali disaccaridi (lattosio, maltosio, saccarosio ed altri) e/o polisaccaridi (amido, cellulosa ed altri) come fonte energetica. Se parliamo invece di fonti di carbonio alternative agli zuccheri troviamo idrolisati proteici o peptoni che forniscono nel terreno colturale sia carbonio che azoto organico, infatti si dimostrano una valida alternativa ai carboidrati nei terreni di arricchimento.

Fonti di azoto: L'azoto è uno degli elementi più importanti nella sintesi degli aminoacidi, delle basi azotate e partecipa alla formazione dei composti proteici ed enzimatici, perciò per la cellula è di vitale importanza che questo elemento sia presente in quantità nell'ordine di grammi/litro nel terreno colturale.

Nei terreni colturali la fonte d'azoto per eccellenza è l'idrolisato proteico o peptone che deriva dalla digestione enzimatica delle proteine presenti in tessuti animali (freschi o congelati) o vegetali.

Esistono anche altre fonti di azoto però di origine inorganica come sali d'ammonio e nitrati, che sono composti reperibili in purezza e quindi usati in terreni colturali particolari come unica risorsa di azoto, ma non solo anche le proteine estratte e purificate dal latte come le caseine o proteine derivate da sieri o sangue di animali sono impiegate come fonte di azoto nei mezzi di crescita per i microrganismi.

Fattori di crescita: sono delle molecole nutrizionali di origine naturale o sintetica aggiunte come componente addizionale alla normale formulazione dei terreni colturali per far fronte al fabbisogno nutrizionale di microrganismi particolarmente esigenti incrementandone lo sviluppo nel mezzo di crescita.

I fattori di crescita si dividono principalmente in due categorie e cioè in macrocomponenti o in microcomponenti:

✚ **Macrocomponenti o macroelementi:** sono composti di origine organica od inorganica che vengono aggiunti **nell'ordine di grammi o milligrammi**, per litro di terreno colturale.

Nella tabella 1.1 vengono messi in evidenza le principali macrocomponenti presenti nei terreni colturali e le loro fonti.

✚ **Microcomponenti o microelementi:** sono elementi di origine organica ed inorganica **presenti in tracce** (microgrammi) nel terreno colturale, necessari a piccole quantità per la vita dei microrganismi e comprendono il rame, il cobalto, il molibdeno, il manganese, il nichel, il vanadio, il selenio e lo zinco che sono presenti nella maggior parte delle componenti impiegate nella preparazione dei terreni.

Molti di questi elementi sono metalli che svolgono la funzione di cofattore enzimatico (cioè una molecola di origine non proteica che associandosi ad un enzima specifico ne attiva le funzioni).

Le migliori fonti di macro e microcomponenti sono i liquidi biologici¹ essenzialmente per due motivi.

Il primo motivo è il costo delle materie prime. Infatti reperire macro e microcomponenti come amminoacidi, vitamine, sali minerali e metalli in purezza comporta un elevato costo per l'azienda, il secondo motivo è l'efficienza nutrizionale dei fattori di crescita nel terreno colturale, cioè fattori di crescita aggiunti in purezza devono essere calibrati e studiati in funzione al microrganismo d'interesse, mentre se viene aggiunto un fattore di crescita ad ampio spettro come il sangue o siero di animali questo assicura un miglior apporto nutritivo ai microrganismi evitando studi relativi alla crescita microbica perché contengono tutti o quasi i micro e macroelementi anche se in dosi non definite.

In commercio i fattori di crescita sia macro- che microcomponenti possono essere già presenti nella normale composizione del terreno colturale liofilizzato² oppure aggiunti in purezza³ o come liquidi biologici⁴ durante le fasi della preparazione dei terreni colturali.

¹e cioè il sangue ed il siero equino, bovino, di coniglio o di pecora ed unica eccezione il tuorlo d'uovo.

²sottoforma di peptoni, estratti di lievito, infusi di carne o di sali come il cloruro di potassio, solfati di manganese, cloruro di litio, amminoacidi, vitamine ed altri.

³come i sali ed i minerali, le vitamine, gli amminoacidi.

⁴come il siero bovino, di cavallo e di montone oppure come sangue bovino, di coniglio, di pecora e di cavallo.

Macrocomponenti tipici	Fonti principali	Ruolo nella cellula
Fosforo	Liquidi biologici ,fosfati inorganici sottoforma di sali, peptoni di origine vegetale ed animale	Sintesi dell' ATP, sintesi degli acidi nucleici , sintesi fosfolipidi, aumenta l'effetto tampone nel terreno colturale
Zolfo	Liquidi biologici , solfati e solfuri sottoforma di sali, peptoni di origine vegetale ed animale	Sintesi degli amminoacidi metionina e cisteina
Potassio	Liquidi biologici , potassio sottoforma di sali come cloruro di potassio ed il potassio solfato , peptoni di origine vegetale ed animale	Cofattore enzimatico della sintesi proteica
Magnesio	Liquidi biologici , sottoforma di sali come magnesio solfato o magnesio glicerofosfato, peptoni di origine vegetale ed animale	Attività stabilizzante dei ribosomi e delle membrane cellulari
Calcio	Liquidi biologici , il calcio sottoforma di sali come il cloruro di calcio ,solfato di calcio, peptoni di origine vegetale ed animale	Stabilizza la parete cellulare ed influisce sulla resistenza delle endospore
Sodio	Liquidi biologici, il sodio sottoforma di sali come il solfato di sodio, cloruro di sodio , peptoni di origine vegetale ed animale	Regola la pressione osmotica
Ferro	Liquidi biologici, sottoforma di sali come solfato di ferro, peptoni di origine vegetale ed animale, in forma purificata ammonio citrato ferrico	Sintesi delle ferro-proteine, regola la respirazione cellulare , attività di cofattore enzimatico per le ossidasi e nitrogenasi

Tabella 1.1 Macrocomponenti tipici con relative fonti e spiegazione del loro ruolo biologico nelle cellule.

Aspetti tecnologici:

Agenti selettivi: sono sostanze di origine naturale (antibiotici) o di sintesi (agenti chimici) che se aggiunte alla composizione del terreno colturale sono in grado d'inibire lo sviluppo dei microrganismi indesiderati.

Gli agenti selettivi si suddividono in:

✚ **Antibiotici:** sono sostanze naturali prodotte da microrganismi che hanno la capacità di uccidere i batteri (battericida) o di controllarne la proliferazione impedendo la scissione microbica (effetto batteriostatico).

Queste sostanze vengono suddivise in base al loro meccanismo d'azione alcuni esempi sono gli antibiotici come la Penicillina, Ampicillina e Cefalosporina che distruggono ed impediscono la sintesi del peptidoglicano dei batteri Gram-positivi, oppure esistono antibiotici che agiscono sui meccanismi di replicazione (Novobiocina, Sulfamidici), di trascrizione (Rifampicina) e di traduzione (Tetraciclina, Kanamicina) dei microrganismi Gram-negativi e Gram-positivi.

✚ **Agenti chimici:** sono sostanze di origine sintetica con effetto batteriostatico sulle forme vegetative di batteri, funghi, virus, ma questo dipende dal tempo di esposizione e dalla dose presente nel terreno colturale.

Negli agenti chimici troviamo composti come i sali biliari (sono molecole tensioattive che vengono adsorbite nella parete dei batteri gram-positivi ed una volta entrate denaturano le proteine), i coloranti, metalli pesanti e gli alogeni.

Agenti tamponanti:La loro funzione nel substrato è quella di mantenere stabile il pH del terreno colturale durante:

- ✚ l'utilizzo dei mezzi colturali; per cui anche se cresce il microrganismo non modifica il pH.
- ✚ i trattamenti termici del terreno (sterilizzazione, pastorizzazione ed altri)
- ✚ la conservazione del terreno nelle celle frigo (+4°C).

Gli agenti tamponanti standard dei terreni colturali sono sali di fosfato, acetati e citrati da ricordare però che se avviene un sovradosaggio di queste componenti nel terreno colturale diventano sequestratori di cationi bivalenti (soprattutto di calcio e magnesio) rendendoli indisponibili per il metabolismo microbico.

Indicatori di pH : sono dei coloranti essenziali per la preparazione dei terreni colturali selettivi e/o differenziali e, sono utilizzati innanzitutto per evidenziare la fermentazione microbica di specifici carboidrati presenti nel terreno colturale.

Il viraggio e l'intensità del colore sono dovuti alla concentrazione di sostanze basiche od acide accumulate nel mezzo di crescita per azione dei microrganismi.

Sostanze gelificanti: L'agar è ricavato da alghe marine agarofite della Classe *Rhodophyceae* che include i generi *Gelidium*, *Pterocladia*, *Gracilaria*. Nel settore microbiologico l'agar più utilizzato è quello del genere *Gelidium* infatti ha :

- ✚ una buona trasparenza allo stato solido;
- ✚ a temperature inferiori ai $\leq 70^{\circ}\text{C}$ si presenta allo stato solido, mentre a temperature $\geq 70^{\circ}\text{C}$ passa allo stato liquido;
- ✚ se acquistato da aziende laboratoristiche certificate l'agar deve essere libero da sostanze tossiche o, contaminanti le quali potrebbero influire negativamente sulla qualità del terreno colturale e sulla salute dell'operatore;
- ✚ una bassa concentrazione di sali;

Non in tutti i terreni è possibile usare l'agar, perché in alcuni metodi d'analisi standardizzate dall'ISO è previsto l'utilizzo di agenti gelificanti differenti come la gelatina, la poliacrilammide, alginati ed altri.

1.4 Tipologie di terreni colturali

La normativa ISO 11133-1 del 2009 attualmente in vigore stabilisce che, i terreni colturali sono una formulazione di sostanze naturali o sintetiche in forma liquida, semisolida o solida necessari per la moltiplicazione, l'identificazione presuntiva, il mantenimento e l'isolamento di ceppi e/o specie di microrganismi patogeni, non patogeni, muffe, lieviti ed entità biologiche come i virus.

Data la definizione di terreno colturale secondo norma è, bene comprendere quali sono le categorie di terreni principali che la ISO 11133-1 classifica in base alla composizione, allo stato fisico ed in funzione alla destinazione d'uso del terreno colturale.

La norma ISO 11133-1:2009 colloca nella categoria della composizione:

I terreni colturali naturali: sono composti reperibili in natura, che contengono le componenti nutrizionali necessarie allo sviluppo dei microrganismi e, sono stati i primi mezzi di crescita utilizzati dai microbiologi essendo gli unici strumenti a disposizione per la crescita dei microrganismi.

Rientrano in questa categoria la stragrande maggioranza degli alimenti, ma i più utilizzati all'epoca furono il pane, la polenta, i mosti d'uva, brodi di carne, frutta e verdura ed altri.

Al giorno d'oggi i terreni colturali naturali rivestono un ruolo di seconda importanza rispetto al largo impiego che se ne faceva centocinquanta anni fa in microbiologia, questo perché sostituiti dai terreni colturali sintetici odierni che risolvono la maggior parte delle problematiche riscontrate nell'impiego dei mezzi di crescita naturali, come ad esempio: le sostanze contenute nel terreno naturale

sono a composizione **variabile e non nota** ostacolando la crescita dei microrganismi che richiedono componenti nutrizionali specifiche e in dosi calibrate, inoltre è molto difficile ottenere una standardizzazione delle componenti nutritive perché variano in base alla freschezza ed alla qualità degli ingredienti impiegati per produrre il mezzo di crescita, limitando l'ottenimento di risultati soddisfacenti e ripetibili in laboratorio.

Altri parametri di rilevante importanza sono **la shelf-life ridotta degli ingredienti** e la loro **stagionalità** che limitano la produzione di terreni naturali ad alcune tipologie ed a quantità limitate.

I terreni colturali sintetici: sono miscele semplici o complesse di nutrienti e fonti energetiche, generalmente in forma di polveri da solubilizzare in acqua.

La ISO 11133-1:2009 suddivide i terreni colturali sintetici in due sottocategorie:




Semplici: si definiscono terreni colturali sintetici **semplici** quei mezzi di crescita nella quale è previsto l'utilizzo d'ingredienti chimicamente definiti ed a concentrazioni note.

Complessi: per terreni colturali sintetici **complessi** s'intende quei mezzi di crescita, nella quale non si conosce in maniera dettagliata la composizione chimica e la concentrazione di una o più componenti.

Attualmente i terreni colturali sintetici grazie alle loro caratteristiche sono diventati la categoria di mezzi di crescita più utilizzata nei laboratori, infatti mediante la liofilizzazione degli ingredienti si possono produrre terreni colturali liofilizzati con una shelf-life elevata (~ 4-5 anni) migliorandone così la conservazione rispetto alle poche settimane o giorni dei terreni colturali naturali.

La meccanizzazione dei processi produttivi e la possibilità di conservare così a lungo le materie prime permettono inoltre di produrre, a livello industriale centinaia di tipologie e quantità considerevoli di terreni colturali pronti all'uso (piastre Petri, provette, bottiglie) estendendone la commercializzazione anche ad aziende sprovviste del reparto produzione terreni.

In funzione alla destinazione d'uso la norma ISO 11133-1:2009 suddivide i terreni colturali in :

-  terreni selettivi
-  terreni differenziali
-  terreni selettivi e differenziali

I terreni **selettivi** sono terreni colturali sintetici che per l'aggiunta di agenti selettivi (agenti antibiotici e/o di agenti chimici) e l'assenza di particolari nutrienti, favoriscono la crescita delle specie o ceppi di microrganismi d'interesse inibendo lo sviluppo della flora microbica indesiderata.

I terreni **differenziali** sono terreni colturali sintetici che consentono di differenziare la presenza/assenza di caratteristiche di crescita specifiche di un certo microrganismo, attraverso cambiamenti di pH con annesso viraggio del colore del terreno, conformazione e colore delle colonie batteriche permettendo così un' identificazione presuntiva del microrganismo sulla base di caratteri biochimici.

I terreni colturali **selettivi e differenziali** combinano le caratteristiche dei terreni sopracitati in un unico terreno colturale sintetico.

In base alla percentuale di agente agarizzante presente nella formulazione del terreno colturale la norma ISO 11133-1 del 2009 divide i terreni colturali in :

- ✚ Liquido: terreno colturale allo stato liquido privo di agente agarizzante.
- ✚ Semi-solido: si usano concentrazioni di agar $\sim 0.05 - 0,5\%$ p/v.
- ✚ Solido: si usano concentrazioni di agar $\sim 1,5 - 2\%$ p/v.

Capitolo 2

Sistemi di Gestione per la Qualità

2.1 Il concetto di qualità e la sua evoluzione nel tempo

In questo capitolo viene trattato il concetto alla base della definizione di qualità, ma prima di parlarne è necessario conoscere la terminologia essenziale per comprendere gli argomenti esposti nel seguente capitolo ed in quelli successivi.

Alcune definizioni base sono i concetti di:

Impresa: organismo che coordina prestazioni di lavoro per finalità di natura economica ottenute mediante la vendita di beni o servizi.

Cliente: secondo un'interpretazione classica, il cliente è sinonimo di consumatore ovvero è un soggetto che richiede prestazioni, prodotti e servizi. Esiste anche un'altra definizione che rivisita in chiave moderna il concetto classico di cliente, suddividendolo in due categorie principali:

- ✚ Cliente esterno: soggetto a cui è destinato il prodotto, un bene o il servizio offerto dall'azienda in pratica è il consumatore finale.
- ✚ Cliente interno: il personale lavorativo all'interno di un'azienda (reparti) e che per questo motivo non acquista un prodotto da utilizzare o un servizio di cui usufruire perché è parte integrante del sistema aziendale.

Processo: è un'attività od un insieme di attività che utilizza risorse e, che è gestita per consentire la trasformazione di elementi in ingresso in elementi in uscita.

Prodotto: è il risultato di processi tecnologici di qualsiasi natura sia meccanica e non con usi o funzioni specifiche in base alla destinazione d'uso.

Norma: secondo la Direttiva Europea n° 34 del 22 giugno 1998 la norma è la specifica tecnica approvata da un organismo riconosciuto a svolgere attività normativa, per applicazione ripetuta o continua la cui osservanza non sia obbligatoria. Quindi sono documenti che definiscono le caratteristiche (prestazionali, ambientali, qualità, sicurezza, di organizzazione ed altre) di un prodotto, processo o servizio, perciò una norma non è una **legge** ed è di applicazione volontaria.

Questo aspetto permette di distinguerla dalle **regole tecniche** che sono di natura obbligatoria, essendo contenute in atti (ad esempio leggi, decreti ed altro) emanati dall'autorità Pubblica e definiscono le caratteristiche e/o i requisiti prestazionali di prodotti o servizi.

Attualmente la struttura normativa opera su tre livelli:

- Internazionale: ISO (*International Organization for Standardization*) tradotto in italiano diventa Organizzazione Internazionale per la Normazione che è stata fondata nel 1947 con sede a Ginevra, ed è la più importante organizzazione a livello mondiale per la definizione di norme tecniche; i membri dell'ISO sono gli organismi nazionali di standardizzazione di 164 paesi tra cui Italia dove le normative ISO vengono recepite, armonizzate e diffuse dall'UNI.
- Europeo: CEN (*European Committee for Standardization*) tradotto in Comitato Europeo per la Normazione fondato nel 1961, è un ente normativo che ha lo scopo di armonizzare e produrre norme tecniche in Europa in collaborazione con gli enti normativi nazionali dei membri europei, oppure con enti internazionali come l'ISO.
- Nazionale: UNI è un acronimo che sta per Ente Nazionale Italiano di Unificazione, è un'associazione privata senza scopo di lucro che svolge attività normativa in tutti i settori ad esclusione di quello elettrotecnico ed elettronico di competenza del CEI (Comitato Elettrotecnico Italiano).

Qualità: la qualità è un concetto complesso, infatti molti tra studiosi, economisti e personaggi politici si sono cimentati nel attribuire a questo termine il giusto significato, ma oggi la normativa ISO 9000 del Novembre 2008 definisce la qualità come *“il grado con cui un insieme di caratteristiche intrinseche ed estrinseche del prodotto o del servizio soddisfano i requisiti dei clienti e di altre parti interessate”*.

La definizione attuale di qualità è il frutto dell'evoluzione del significato che il concetto ha assunto nel corso degli anni, infatti agli inizi del 1900 negli Stati Uniti d'America con la produzione industriale di massa, nacque l'esigenza per le aziende di differenziare i loro prodotti nel mercato vista la crescente competizione. Venne coniato così il termine **Qualità**.

All'epoca fare qualità significava mirare all'eccellenza o ricercare la perfezione dei prodotti per competere con la concorrenza, quindi era un approccio ristretto rivolto più al prodotto finale, od alla soddisfazione del cliente che all'azienda in genere.

Si parla quindi di **qualità di prodotto** e cioè la conformità del prodotto a specifici standard di qualità previsti da normative o da regole e parametri stabiliti dall'azienda.

Arrivati negli anni '50 Armand Feigenbaum⁵ sviluppa un processo di controllo della qualità e cioè: *“Un sistema efficace per integrare gli sforzi di sviluppo, mantenimento e miglioramento della qualità dei vari gruppi di un'organizzazione in modo tale che la produzione si svolga ai massimi livelli di economia compatibilmente con la soddisfazione del cliente”* conosciuto oggi come il Sistema di Garanzia della qualità (Quality Assurance).

⁵ Ingegnere americano è il teorizzatore del Total Quality Management.

La qualità assume quindi un significato che viene esteso a tutte le funzioni aziendali, cioè si focalizza l'attenzione sui processi aziendali e nel coordinare l'interazione tra i vari reparti, ma soprattutto si parla per la prima volta di soddisfare le esigenze del cliente rivoluzionando il concetto stesso di qualità dei primi del Novecento, viene coniato quindi il concetto di **qualità di processo** che è definito come l'insieme dei requisiti che caratterizzano il ciclo di produzione di un determinato prodotto, cioè la qualità di un ciclo produttivo dipende dunque dalla qualità dei risultati raggiunti da ogni singolo processo aziendale.

I presupposti della garanzia della qualità erano buoni, ma fino agli inizi degli anni '60 il concetto di qualità resta legato all'ambito manageriale ed ingegneristico mentre il personale dell'impresa è considerato solo un fattore di produzione, ma la maggioranza dei costi aziendali proviene proprio dai processi produttivi. Perciò le aziende cominciarono a sensibilizzare i dipendenti sulla qualità del loro lavoro ed a suscitare in loro la coscienza di "fare le cose bene fin dall'inizio" cercando di apportare un cambiamento radicale nella lavorazione del prodotto e di valorizzare il ruolo del lavoratore nell'impresa .

Per avere una vera e propria "cultura della qualità", basata principalmente sulla soddisfazione del cliente, sul miglioramento continuo del servizio offerto, sulla formazione del personale, sul coinvolgimento e sull'impegno di tutto il personale dell'azienda, si deve aspettare fino agli anni '90.

Questi obiettivi si ottengono come afferma Franco D'Egidio⁶ nel 1998, *"prima di "fare" bisogna "essere" qualità. Il fare si basa su conoscenze e abilità specifiche quindi sulle competenze del personale, l'essere si erge su valori profondamente condivisi e sui giusti atteggiamenti mentali."*

Sulla base di questa definizione possiamo dire che la soddisfazione del cliente diventa quindi la vera priorità operativa dell'azienda e che il profitto è il premio di questa soddisfazione e il fatturato la sua misura. Questo risultato non è ottenibile semplicemente fornendo un prodotto di qualità e mantenendolo costante nel tempo, perché soddisfazione presume miglioramento.

Solo i miglioramenti continui del prodotto o del servizio fornito, possono garantire un elevato grado di soddisfazione del cliente in modo tale da condizionarlo positivamente per il prossimo acquisto.

In conclusione come abbiamo potuto constatare, la qualità è un concetto:

- ✚ dinamico perché **varia nel tempo** adattandosi a quelle che sono le nuove esigenze di mercato;
- ✚ applicabile a tutte le organizzazioni, indipendentemente dalla loro tipologia, dalla loro dimensione, dalle tecnologie produttive utilizzate, dal prodotto fornito e dal numero dei dipendenti che compongono l'impresa;

⁶ Amministratore delegato della Summit un'agenzia di consulenze sulla gestione della qualità di processo e pioniere dello studio del capitale umano in Italia.

✚ gestibile attraverso l'implementazione di reparti rivolti al Controllo Qualità o tramite la consulenze con enti esterni all'azienda.

✚ **certificabile ed accreditabile**

Spesso vi è confusione riguardo al significato di questi due termini, quindi è opportuno spiegarne la differenza:

per **“accreditamento”** s'intende il riconoscimento formale di competenza che si basa su una comprovata conoscenza tecnica e pertanto richiede la consultazione di un esperto tecnico per lo scopo dell'accreditamento, ad esempio l'accreditamento ISO/IEC 17025 applica criteri e procedure specificatamente predisposte per determinare la competenza tecnica di un laboratorio, mentre la **“certificazione”** riguarda principalmente assicurare la conformità di uno o più processi dell'azienda ad una data norma come ad esempio, la certificazione ISO 9001 del 2008 di un'azienda che dichiara la conformità ai requisiti della norma (non è collegata ad una competenza tecnica) e riguarda principalmente la gestione generale, i processi e la manipolazione dei dati.

2.2 I principi del Sistema di Gestione per la Qualità (SGQ)

Nel mondo aziendale non basta riuscire solo a fare Qualità ma è bene sapere anche come gestirla e conoscere in che modo influisce nel sistema lavorativo aziendale, per questo preciso motivo si è deciso di realizzare un Sistema di Gestione per la Qualità (SGQ).

I due principi cardine che stanno alla base della definizione di Sistema di Gestione Qualità sono:

Sistema: per sistema s'intende un insieme di oggetti (reparti, componenti, funzioni ecc.) legati tra loro da relazioni di interdipendenza.

Interdipendenza significa che se si apporta un miglioramento su un singolo reparto dell'azienda, questa modifica ha ripercussioni anche sugli altri reparti del ciclo di produzione.

Gestione: significa organizzare, gestire ed applicare a tutte le fasi di produzione i principi del Sistema di Gestione per la Qualità, a partire dall'identificazione iniziale delle esigenze e delle aspettative del cliente fino al loro soddisfacimento.

L'applicazione di questi concetti a livello pratico che si traducono in **Total Quality Management (TQM)** ovvero Gestione Totale della Qualità, cioè un modello organizzativo di riferimento previsto da normative internazionali per la gestione della qualità adottato **volontariamente**.

Lo scopo principale dell' SGQ è di fornire un valido aiuto per controllare e gestire la qualità ed è finalizzato al contenimento dei costi di produzione.

Nello sviluppo di un Sistema di Gestione per la Qualità il passo successivo è quello di adeguamento alle normative di riferimento ed ai requisiti di base per ottenere l'accreditamento o la certificazione dell'azienda.

2.2 ISO 9001:2008

La normativa ISO 9001 del Novembre 2008 specifica i requisiti di un Sistema di Gestione per la Qualità, che possono essere utilizzati per le applicazioni interne (regolamenti aziendali) e/o per la certificazione dell'azienda. La norma focalizza l'attenzione sull'efficacia dell' SGQ nel soddisfare i requisiti del cliente.

La norma ISO 9001:2008 fa parte di una serie di norme che propongono un sistema di gestione della qualità pensato per gestire i processi aziendali:

- ✚ ISO 9000:2005 - Definizioni e dizionario dei termini;
- ✚ ISO 9001:2008 - Requisiti per il SGQ;
- ✚ ISO 9004:2009 - Linee guida per la gestione della qualità delle aziende;

L'unica norma vera e propria è la 9001 del 2008 dato che è valida per la certificazione, mentre le linee guida (ISO 9000, ISO 9004) sono facoltative e servono per favorire la corretta applicazione ed interpretazione dei principi dell'SGQ.

Come già accennato in precedenza l'applicazione di una norma prescinde dalla dimensione, o dal settore dell'attività e definiscono i principi che l'azienda deve seguire ma non indica in alcun modo come l'azienda debba realizzare il prodotto.

In Italia il nome della norma completo è UNI EN ISO 9001:2008 in quanto è stata armonizzata, pubblicata e diffusa dall' Ente Nazionale Italiano di Unificazione (UNI) e dal Comitato Europeo di Normazione (CEN).

2.2.1 Requisiti generali dell'organizzazione/azienda

I requisiti preliminari che un'azienda od organizzazione deve soddisfare per ottenere la certificazione UNI EN ISO 9001:2008 sono:

- ✚ L'aspirazione di accrescere la soddisfazione del cliente tramite l'applicazione efficace dell' SGQ .
- ✚ L'esigenza di dimostrare la propria capacità di fornire con regolarità un prodotto che soddisfi le richieste e le aspettative del cliente e della norma.
- ✚ Dimostrare che i processi produttivi siano monitorati, analizzati e misurati (dove possibile) con criteri e metodi validati, per assicurare il corretto funzionamento del processo e favorire il controllo e l'eventuale correzione od aggiornamento.

2.2.2 Requisiti relativi alla documentazione

Un laboratorio che desidera certificarsi ISO 9001:2008 oltre a possedere i requisiti sopracitati, deve inoltre produrre la documentazione necessaria che comprende:

- ✚ Dichiarazioni documentate di una politica per la qualità: dichiarazione nella quale sono elencati e spiegati gli obbiettivi aziendali in materia di gestione della qualità.
- ✚ Il manuale della qualità: cioè un manuale che ha lo scopo di descrivere le strategie adottate dall'azienda per una gestione efficace ed efficiente della qualità attraverso l'implementazione della normativa UNI EN ISO 9001:2008.
- ✚ Documenti e registrazioni necessari per assicurare l'efficace monitoraggio dei processi laboratoristici.

La documentazione richiesta può differire da un'organizzazione ad un'altra in funzione della dimensione dell'azienda, dal tipo di attività svolta, dalla complessità dei processi e delle loro interazioni. Devono inoltre essere definite modalità di controllo necessarie per approvare, aggiornare, identificare, archiviare, proteggere e conservare la documentazione richiesta dalla normativa, per fornire prove evidenti in caso di verifiche da parte dell'ente certificatore.

Capitolo 3

Processo di produzione dei terreni colturali

Per garantire risultati accettabili e ripetibili nel tempo è necessario monitorare il processo di preparazione dei terreni colturali. Il processo produttivo è previsto dalla prima parte della normativa UNI EN ISO 11133 del 2009 che definisce le linee guida generali per la garanzia di qualità nella preparazione dei terreni colturali in laboratorio. Il processo di produzione descritto in questo capitolo fa riferimento ad una realtà precisa, presente nell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE). Lo scopo principale di questo processo è di realizzare i mezzi di crescita richiesti dai clienti, secondo le modalità previste dalle normative vigenti o dalle schede di produzione ricevute dai fornitori.

In questo capitolo è essenziale conoscere alcuni termini di base come:

Buone Pratiche di Laboratorio: sono indicazioni scritte, create per fornire al personale la corretta modalità di lavoro in un laboratorio.

Pericolo: agente chimico, fisico o biologico presente nell'ambiente che può recare un danno.

Rischio: è la probabilità con cui si concretizza e la gravità delle conseguenze dell'esposizione ad uno o più pericoli.

CCP: punto di controllo critico, cioè una fase della lavorazione nella quale si può intervenire per tenere sotto controllo uno o più fattori di rischio, ed è un parametro che deve essere monitorato continuamente.

CP: attività di un processo in cui può avvenire una contaminazione del prodotto. Quindi un Punto di Controllo (CP) non è sempre un Punto di Controllo Critico (CCP).

Limite critico: sono parametri chimici, fisici e microbiologici che se monitorati consentono di stabilire se un processo è effettivamente sotto controllo o no.

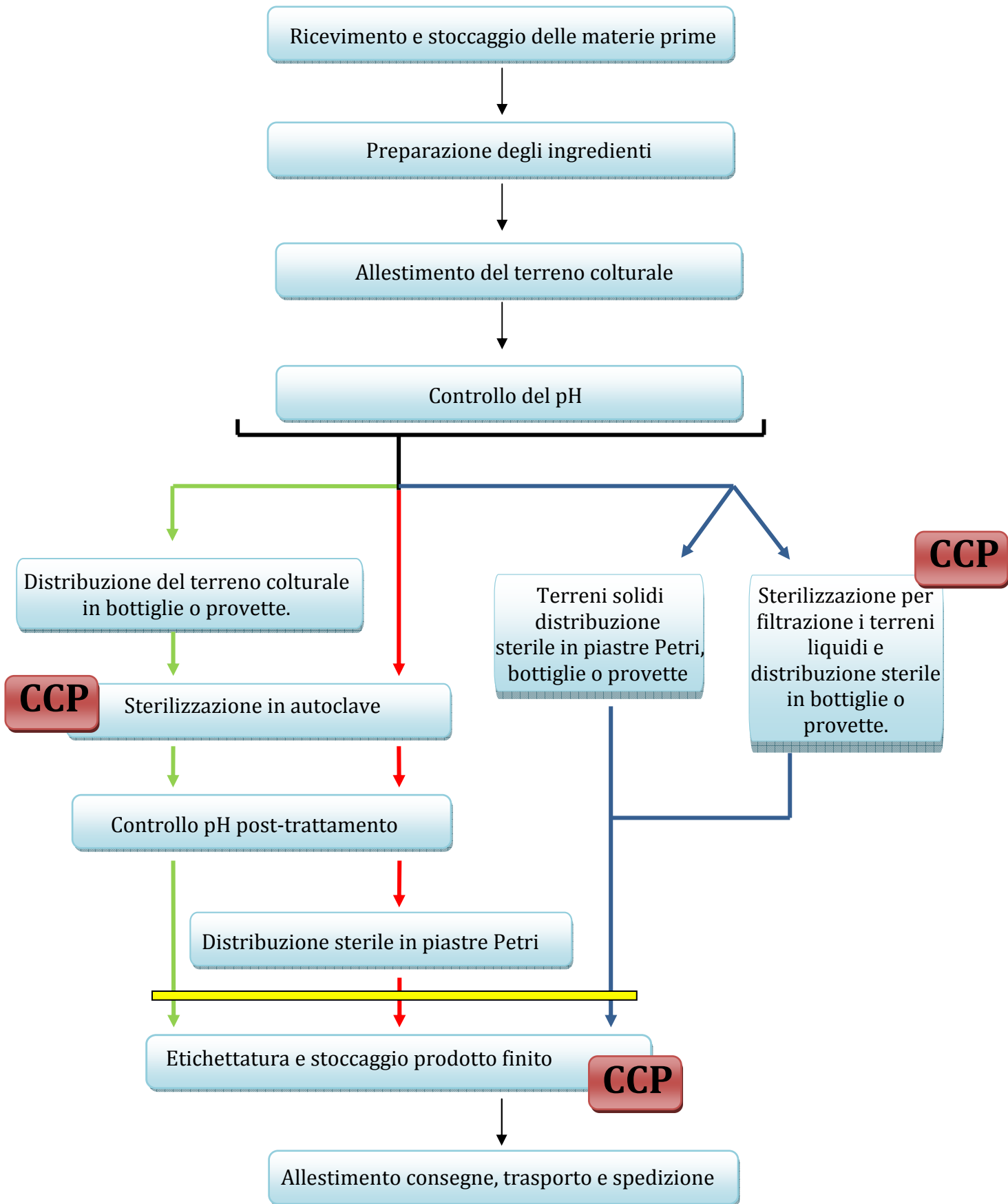


Figura 3.1 Flow - chart del sistema di produzione dei terreni colturali.

3.1 Descrizione del flow-chart di produzione

Nella figura 3.1 è illustrato il flow-chart del processo di produzione dei terreni colturali in atto nell'IZSve, che inizia con l'arrivo delle materie prime utilizzate (intese come terreni colturali liofilizzati, nutrienti in purezza liofilizzati, fattori di crescita, ceppi di controllo, materiali, sangue defribinato di cavallo ed altro) per la produzione dei terreni colturali. Prima dell'accettazione vengono effettuati controlli di conformità degli imballaggi, come ad esempio il controllo delle date di scadenza (possibili rilevazione di prodotti scaduti), il controllo se le quantità e la tipologia di merce ricevute corrispondono a quelle ordinate, controllo delle temperature dei prodotti all'arrivo.

La maggior parte delle materie prime impiegate nella realizzazione dei terreni colturali vengono conservate a temperatura ambiente, ci sono però alcune eccezioni come i fattori di crescita che per l'elevata deperibilità devono essere mantenuti a temperature di refrigerazione da +2°C a +8°C, questo vale per il tuorlo d'uovo e il sangue animale, mentre per il siero e il plasma vanno conservati a temperature di congelamento (da -18°C a -20°C), per impedire la degradazione enzimatica delle componenti nutrizionali presenti.

Se le materie prime risultano idonee all'accettazione si procede allo step successivo cioè lo stoccaggio.

Le materie prime vengono immagazzinate secondo due criteri fondamentali il primo è lo stoccaggio in base alle temperature di conservazione idonee, il secondo in base al criterio FIFO (*First In First Out*) dove il materiale stoccato per primo (*first in*) è anche il primo ad essere prelevato (*first out*).

Il personale adibito alla pianificazione del processo di produzione deciderà come organizzare il lavoro in base alle richieste pervenute dal reparto accettazione ordini, stabilendo un piano di produzione dei terreni colturali.

Una volta realizzato il programma lavorativo, si calcola la quantità di terreno liofilizzato da pesare moltiplicando il numero delle componenti espresso in gr/l per il volume desiderato espresso in litri, dopodiché il terreno viene sciolto in acqua deionizzata (in un distillatore continuo l'acqua viene fatta passare attraverso dei filtri costituiti da resine speciali, dove rimane come retentato la maggior parte delle molecole e degli ioni; per quanto riguarda la parte organica viene separata dall'acqua con carbone attivo, l'acqua così ottenuta entra in un bidistillatore *Milliq* dove gran parte degli ioni H⁺ vengono rimossi e la carica microbica eliminata attraverso filtri a membrana da 0.22 µm) secondo due modalità a seconda della tipologia di terreno colturale :

- ✚ **Discioglimento a riscaldamento diretto:** questo metodo è indicato per i terreni liquidi, infatti si pone la beuta con il terreno colturale a contatto diretto con la fiamma, avendo l'accortezza di mescolarlo frequentemente per evitare che il terreno colturale aderisca al fondo formando incrostazioni e si porta all'ebollizione (+100°C) per 5-10 minuti.

- ✚ **Discioglimento a riscaldamento indiretto:** tale modalità è indicata per i terreni solidi, infatti si pone il contenitore in un bagnomaria o simili regolato a +85°C, assicurandosi di mescolare frequentemente fino al completo scioglimento delle componenti aggregate di terreno colturale.

Una volta disciolto il terreno colturale si effettua un primo controllo del pH. Se il pH del terreno colturale si discosta dai valori previsti dalle indicazioni fornite dal produttore, si corregge utilizzando una soluzione circa 1 M di NaOH o una soluzione circa 1 molare di HCl, in modo tale che dopo i trattamenti successivi il pH si modifichi solamente di +/-0,2 unità rispetto al previsto.

Di norma i terreni colturali preparati a partire da componenti disidratate possono mostrare significative variazioni del pH prima e dopo i trattamenti termici pertanto, se si è sicuri di non aver commesso errori nelle operazioni effettuate, la correzione del pH prima della sterilizzazione è facoltativa.

Il controllo del pH effettuato dopo la fase di discioglimento è obbligatorio se il terreno colturale non subisce trattamenti di sterilizzazione mediante l'uso di autoclave, quindi il terreno colturale in questo caso viene sterilizzato mediante filtrazione con filtri monouso da 0,22 µm o 0,45 µm e successivamente distribuito sterilmente in bottiglie, provette o piastre Petri come si evince dalla figura 3.1 seguendo la freccia di color blu scuro, il limite critico di quest'attività è se effettivamente il filtro funziona e quindi in caso di non conformità bisogna verificarne il corretto funzionamento e provvedere ad un'eventuale rifornimento.

Dopo il primo controllo del pH i terreni colturali destinati alla distribuzione in piastre vengono direttamente sterilizzati in autoclave (freccia rossa figura 3.1), questo vale anche per i terreni colturali che vengono distribuiti già in provette o bottiglie (freccia verde).

La sterilizzazione viene eseguita impostando la temperatura dell'autoclave a 121°C ± 3°C per 15 minuti, salvo diverse indicazioni previste nelle schede di produzione, infatti non tutti i terreni colturali vanno sterilizzati seguendo questi parametri standard, perché le componenti presenti nel terreno colturale possono essere distrutte con il trattamento termico e perciò si usano altri programmi di sterilizzazione come ad esempio il programma a 116°C per 20 minuti o 102°C per 20 minuti.

La sterilizzazione in autoclave è un punto di controllo critico perché la corretta gestione di questa attività permette di eliminare dal prodotto ogni forma di vita comprese le spore, il limite critico è quello di mantenere effettivamente la temperatura a 121°C per 15 minuti durante il processo perciò il corretto monitoraggio è quello di verificare periodicamente il funzionamento dell'autoclave, segnalare e risolvere eventuali problematiche riscontrate (sonda che non segnala bene la temperatura ed altro).

Ultimato il processo di sterilizzazione in autoclave viene effettuato un secondo controllo del pH; se questo non rientra nel range previsto l'intero lotto di produzione viene eliminato, questo vale sia per i terreni colturali distribuiti in bottiglie o in provette che per i terreni contenuti nelle beute. Per i terreni colturali

già distribuiti in provette⁷ o bottiglie una volta terminata la sterilizzazione mediante l'autoclave vengono lasciati raffreddare a temperatura ambiente, mentre le beute vengono collocate in bagnomaria a +47°C, al fine di evitare la solidificazione dell'agar prima dell'uso previsto.

Se nella scheda tecnica del terreno colturale è prevista l'aggiunta alla formulazione di agenti selettivi e/o di fattori di crescita si devono considerare le seguenti indicazioni:

- ✚ agenti selettivi e/o i fattori di crescita non si possono aggiungere nel terreno colturale prima della sterilizzazione in autoclave perché distrutti dal trattamento termico;
- ✚ è sconsigliato aggiungerli al terreno colturale quando si trova a temperature elevate, perché la differenza di temperatura tra gli elementi aggiunti ed il mezzo colturale causa la formazione di flocculi o aggregati di agar rendendo inservibile il terreno per la distribuzione in piastre Petri o provette;

Quindi mentre il terreno colturale viene sterilizzato o lasciato a riposo nel bagnomaria, i fattori di crescita e gli antibiotici vengono lasciati a temperatura ambiente in modo da evitare questo problema che si riscontra principalmente nella produzione dei terreni colturali solidi e semisolidi.

In condizioni di sterilità le piastre da 90 o 100 mm di diametro vengono riempite attraverso l'uso di una pipetta con 18 - 20 ml di terreno colturale, in modo da ottenere uno spessore di circa 4 mm (salvo diverse indicazioni). Un problema che potrebbe verificarsi è la formazione di bolle d'aria nella superficie del terreno colturale in questo caso si usa un flambatore a pistola per la rimozione, successivamente le piastre Petri vengono lasciate semichiusure in modo da poter far raffreddare il terreno colturale più velocemente ed, evitare la formazione di condensa nella parte superiore della piastra, una volta che il terreno si è solidificato viene chiuso e lasciato a temperatura ambiente per una notte, dopodiché viene stoccato a temperature di refrigerazione in attesa del responso del controllo qualità.

La linea gialla presente nel flow-chart rappresenta il punto dove avviene il controllo di qualità, perciò vengono prelevati i campioni di terreno colturale dai lotti prodotti e se risultano conformi agli standard stabiliti si procede al confezionamento e alla successiva distribuzione dei terreni colturali:

- Le piastre Petri vengono confezionate in un film plastico termoretraibile che provvede a proteggerle da agenti fisici e contaminazioni microbiche, dopodiché saranno etichettate. La confezione contiene 10 piastre di terreno colturale.
- Le bottiglie contenenti il terreno colturale vengono etichettate una ad una ed inserite in appositi contenitori che possono contenere dalle 40 o 50 bottiglie in modo da agevolare il trasporto e l'immagazzinamento.

⁷ Alcuni terreni solidi in provette vengono lasciate raffreddare su di un'asta disponendole leggermente inclinate permettendo la formazione dello slant, conosciuto come becco di clarino.

- Le provette invece vengono inserite in apposite scatole che possono contenere dalle 25 alle 30 provette e l'etichettatura viene fatta direttamente nella confezione.

L'etichetta contiene diverse informazioni tra cui: nome del terreno, numero di lotto di produzione, data di preparazione e data di scadenza.

Le confezioni di terreno colturale in piastra vengono stoccate capovolte, evitando la caduta di gocce di condensa sulla superficie del terreno colturale, mentre i terreni semisolidi in piastra data la loro elevata delicatezza, se capovolti potrebbero rompersi rendendo il terreno inservibile.

I terreni colturali preparati vanno conservati al buio, in condizioni tali da non produrre alcuna modificazione alla loro composizione, seguendo i parametri presenti nella tabella 3.1.

TERRENI	DURATA	CONSERVAZIONE
Terreni non supplementati in bottiglie a chiusura ermetica privi di fattori di crescita o antibiotici	6 mesi	Cella frigo (5°C ± 3°C) possono essere conservati anche a temperatura ambiente
Terreni in provetta addizionati o meno di fattori di crescita o antibiotici	Dai 3 o 4 mesi	Cella frigo (5°C ± 3°C)
Terreni colturali in piastra Petri, bottiglia a chiusura ermetica con fattori di crescita o antibiotici	Da un minimo di 15 giorni fino ad un massimo di 2 mesi	Cella frigo (5°C ± 3°C)

Tabella 3.1 Temperature di conservazione e shelf-life media dei terreni colturali prodotti in laboratorio.

Lo stoccaggio è il secondo punto critico del processo di produzione dei terreni colturali perché una corretta conservazione del prodotto finito ne determina il mantenimento delle caratteristiche chimico-fisiche e tecnologiche, in questo caso il limite critico è quello di mantenere le temperature di refrigerazione del terreno colturale dall'azienda fino al suo utilizzo.

I terreni colturali prodotti vengono consegnati all'addetto al magazzino che opera secondo il criterio FIFO anche per lo stoccaggio dei prodotti finiti in base al quale i lotti che vengono stoccati prima sono i primi che devono essere distribuiti.

In concomitanza con lo stoccaggio di nuovi lotti e durante l'allestimento delle consegne avviene la verifica della presenza di eventuali terreni colturali scaduti in magazzino, l'addetto al magazzino in base alle richieste prepara le confezioni per l'invio alle varie aziende e clienti richiedenti.

La consegna dei prodotti finiti deve avvenire nei tempi (secondo il programma stabilito) e nei modi (mantenendo inalterate le caratteristiche del prodotto durante il trasporto ad esempio con l'uso di automezzi muniti di cella frigo +4°C) concordati con il cliente e secondo le disposizioni normative vigenti.

Capitolo 4

Controllo Qualità

Prima di descrivere i controlli qualitativi effettuati nei terreni colturali è importante conoscere la differenza tra “controllo qualità” e “controllo di qualità”.

Il “controllo qualità” è una struttura (reparto aziendale, ente certificatore o di accreditamento ed altro) preposta al controllo ed alla gestione della qualità.

Il controllo di qualità invece consiste in una serie di procedure che consentono di verificare la qualità di un prodotto o di un processo, è quindi la valutazione continua dello stato delle procedure, dei metodi di analisi e dei dati prodotti dal laboratorio, con l’obiettivo di ridurre al minimo tutte le circostanze che potrebbero comportare a non rispettare gli standard prefissati dalle norme.

L’attuazione di programmi di controllo e monitoraggio della qualità, comporta un carico di lavoro non indifferente ma è comunque un’attività necessaria se si considerano gli effetti sui risultati finali (benefici dell’applicazione del Sistema di Gestione per la qualità). In questo capitolo vengono descritti i controlli di qualità effettuati nei terreni colturali per microrganismi prima del loro commercio o distribuzione.

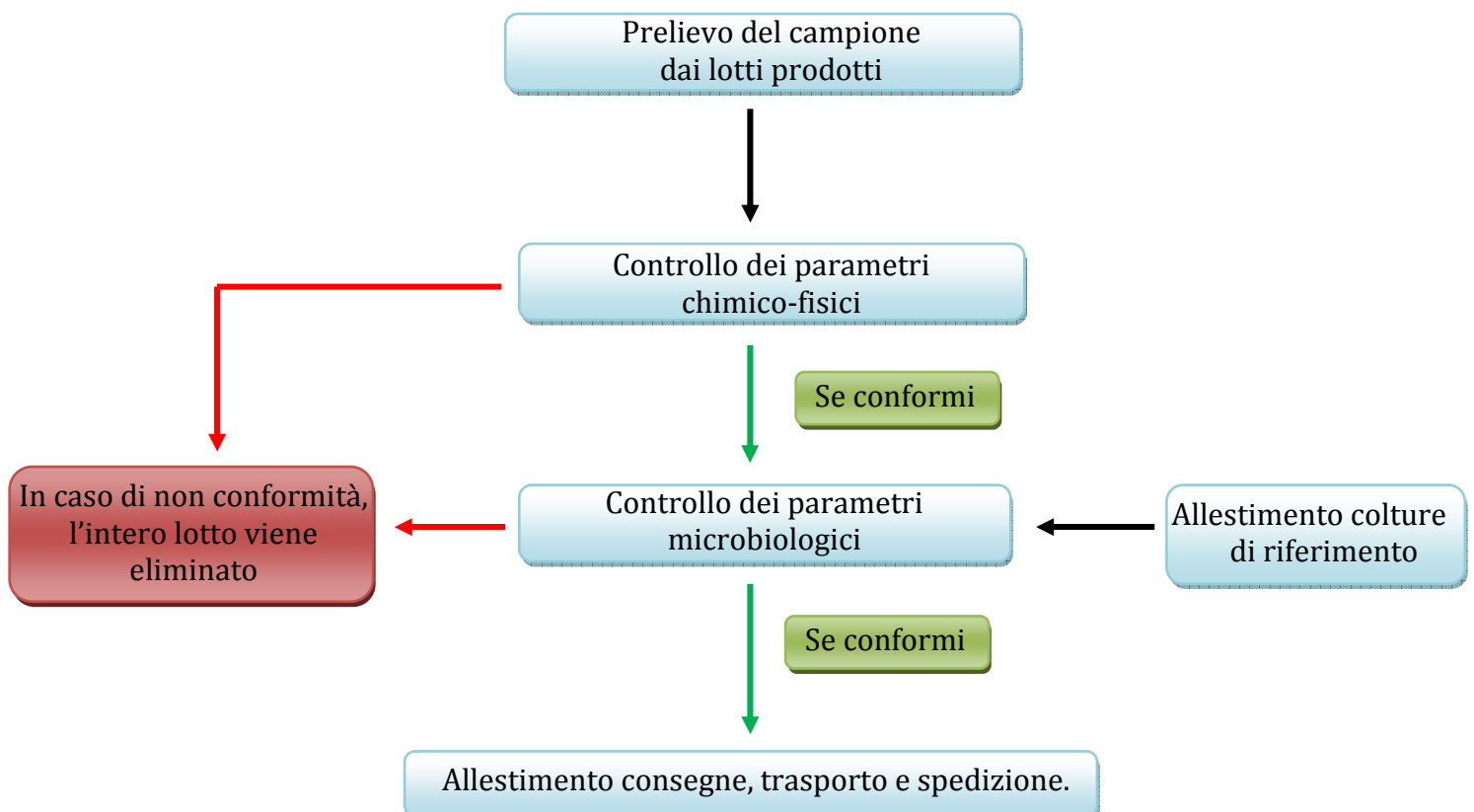


Figura 4.1 Flow - chart controllo di qualità dei terreni colturali.

Secondo il flow-chart riportato nella figura 4.1, una volta che il lotto di terreno colturale viene prodotto ed immesso negli appositi supporti (piastre Petri, bottiglie, provette ed altro) gli addetti preposti al controllo qualità gestiscono l'allestimento delle colture di riferimento impiegate nei test di controllo microbiologico.

4.1 Ceppi di riferimento

Alcuni termini base impiegati in questo paragrafo sono:

Ceppo di riferimento: microrganismo definito a livello di genere e specie, catalogato e descritto in relazione alle sue caratteristiche e preferibilmente di origine nota.

Stock di riferimento: un set di colture pure ottenute in laboratorio da un ceppo di riferimento.

Coltura di lavoro primaria: una subcultura primaria derivata da uno stock di riferimento.

Ceppoteca: insieme dei ceppi di riferimento

Cryobank: fiala contenente granuli porosi che servono come mezzo di supporto per i microrganismi immersi in un liquido criocconservante o crioprotettivo cioè una sostanza che ha il ruolo di proteggere la cellula batterica dai danni causati dal congelamento (formazione dei macrocristalli = lisi cellulare).

All'arrivo in laboratorio i ceppi batterici di riferimento vengono sottoposti a verifica dell'identità mediante appropriati test biochimici, in caso di esito positivo dei test si procede al loro stoccaggio e conservazione in ceppoteca.

La conservazione a lungo termine delle colture di riferimento può essere eseguita secondo due modalità:

- liofilizzazione della coltura con l'aggiunta dell'agente crioprotettivo cioè latte scremato UHT con grasso in concentrazione non superiore all' 0.1%, e conservato a temperature di refrigerazione(+5°C).
- congelamento. La conservazione avviene in cryobank in congelatore a -80°C o in azoto liquido a -196°C.

La conservazione deve garantire la minima possibilità di danneggiamento del microrganismo e quindi sono da evitare ripetuti passaggi di congelamento e scongelamento della cryobank, inoltre bisogna assicurare un'efficiente identificazione del materiale stoccato nella ceppoteca mediante adeguata etichettatura.

A partire dalle colture di riferimento conservate, si procede alla loro rivitalizzazione per l'utilizzo quotidiano in laboratorio realizzando una coltura di lavoro primaria.

La rivitalizzazione dei ceppi di riferimento viene eseguita secondo due modalità:

ceppo congelato a -80°C: da una cryobank si preleva sterilmente una perlina e si introduce nello specifico brodo colturale di arricchimento Tryptone Soy Broth + Yeast extract (TSB+Ye) , Brodo Triptone Soia + Estratto di Lievito.

ceppo liofilizzato: prelevare un flaconcino dal frigorifero, aprirlo ed aggiungere il brodo di arricchimento idoneo (TSB+Ye), lentamente al fine di evitare la formazione di schiuma.

Incubare per 24-48 h alla temperatura ottimale del microrganismo, verificarne la vitalità (torbidità del brodo) e la purezza, eseguendo una colorazione di Gram.

Effettuati questi passaggi si parla di coltura di lavoro primaria.

Per produrre aliquote per l'uso routinario, alla coltura di lavoro primaria viene aggiunto sterilmente il 20% di glicerolo (agente crioprotettivo); una volta miscelato la coltura di lavoro viene frazionata in aliquote da 1 ml circa in provettine di plastica monouso e conservate nel freezer a -80°C. Al momento dell'occorrenza nei test di controllo di qualità microbiologico vengono prelevate e lasciate scongelare a temperatura ambiente, ed infine utilizzate come una normale brodocoltura, allestendo quindi delle diluizioni decimali successive in Soluzione Triptone (1ml della brodocoltura o di una sua diluizione in 9 ml di diluente in provetta).

Va tenuto presente, indicativamente, che una brodocoltura di 24 ore contiene circa 10^8 UFC/ml e che una volta scongelata è da conservare a temperature di refrigerazione (+5°C) ed eliminare al massimo dopo una settimana dal suo scongelamento.

Terminate le provettine della coltura di lavoro primaria, si procede ad un nuovo ciclo di produzione partendo sempre dallo stock di riferimento.

4.2 Controllo di Qualità nei terreni colturali

Quando il terreno colturale è ultimato viene prelevato un campione dal lotto di produzione dagli addetti al controllo qualità che eseguono i controlli previsti dalla normativa UNI EN ISO 11133-2 del 2011, la quale descrive le metodiche standard essenziali per definire ed assicurare le caratteristiche qualitative dei terreni colturali.

Il campione rappresentativo deve essere prelevato in modo casuale dal lotto di terreno colturale, secondo la modalità previste dalla norma, che variano a seconda delle dimensioni del lotto come riportato nell'esempio della tabella 4.1.

CONSISTENZA DEL LOTTO (UNITÀ PRODOTTE)	UNITÀ DA PRELEVARE
fino a 100	2
da 101 a 250	3
da 251 a 500	5
oltre 501	10

Tabella 4.1 Unità campionarie prelevate per la sterilità in funzione della consistenza del lotto.

Una volta prelevato il campione dal lotto di terreno colturale, gli addetti del reparto controllo qualità effettuano un primo test sui parametri chimico-fisici.

4.2.1 Qualità dei parametri chimico-fisici

Per qualità dei parametri chimico-fisici s'intende la valutazione delle caratteristiche intrinseche del terreno colturale intese come l'aspetto, il pH e l'attività dell'acqua. Questi parametri sono i primi che vengono misurati dagli operatori del controllo qualità, in quanto la loro rilevazione e misurazione è semplice, rapida e poco costosa. Nel caso in cui si rilevassero delle non conformità durante il controllo di questi parametri il lotto verrebbe scartato risparmiando i costi di un successivo controllo microbiologico.

Problema	A	B	C	D	E	F
Colore anormale	✓	✓	✓			
Precipitato	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Imbrunimento	✓			✓	✓	✓

Tabella 4.2 Problematiche e possibili cause dell'alterazione dell'aspetto dei terreni colturali.

Nella tabella 4.2 si notano le principali non conformità che riguardano l'aspetto dei terreni colturali la ✓ indica la presenza di una possibile causa codificata con le lettere dell'alfabeto dalla A alla F.

A = non conformità dovuta all'utilizzo di terreno colturale disidratato scaduto;

B = non conformità dovuta all'utilizzo di vetreria sporca;

C = acqua non filtrata correttamente, presenza di particelle in soluzione;

D = non conformità dovuta all'errato dosaggio di terreno liofilizzato;

E = miscelazione incompleta del liofilo;

F = non conformità dovuta all'eccessivo surriscaldamento del terreno colturale

Un altro parametro valutato nei terreni colturali è il pH del terreno. Il valore del pH dipende strettamente dalla composizione del terreno colturale e dai trattamenti che esso ha subito durante il processo produttivo, quindi per stabilire se rispecchia i requisiti qualitativi necessari, basta confrontare il valore di pH del terreno colturale ottenuto, con il valore di pH specificato nella scheda tecnica, se non corrispondono (tolleranza di ± 0.3), pena l'eliminazione del lotto produttivo.

Qualità dell'acqua e Aw (attività dell'acqua): l'acqua utilizzata nella produzione di terreni colturali può essere acqua distillata o di qualità equivalente e deve

essere distillata di fresco. Per essere considerata di buona qualità, l'acqua distillata deve avere una conducibilità⁸ $\leq 25 \mu\text{S cm}^{-1}$ a 25°C.

L'attività dell'acqua varia in funzione alla quantità di acqua evaporata dal terreno colturale durante il periodo di conservazione, in questo caso si parla di scorretta conservazione dei mezzi di crescita, perché l'acqua che evapora causa una concentrazione dei soluti, abbassando così l'attività dell'acqua del mezzo e sfavorendo lo sviluppo microbico.

La contaminazione microbica dell'acqua deve essere verificata regolarmente con l'analisi di 100 μl d'acqua nel terreno colturale Plate Count Agar (PCA), incubato a 22°C per 68 ore. I risultati devono rispettare i limiti imposti dalla ISO 11133-2:2011 che prevede una concentrazione di microrganismi $\leq 10^2$ UFC/ml.

4.2 Controllo di qualità microbiologico

I controlli di qualità microbiologica valutano essenzialmente due parametri: il primo è il controllo di sterilità, cioè prove che si eseguono per verificare la completa assenza di microrganismi contaminanti in terreni colturali, mentre il secondo parametro è la performance del mezzo di crescita e cioè la risposta di un terreno colturale quando viene testato con ceppi di controllo in condizioni definite dalle schede tecniche.

Controllo di sterilità: In un laboratorio che effettua analisi microbiologiche è di fondamentale importanza assicurare la sterilità dei materiali, perché la presenza di flora microbica indesiderata nel mezzo di crescita può interferire con i risultati di analisi od inibire la crescita dei microrganismi inoculati.

Quindi si riassume a livello pratico con il prelievo di un campione rappresentativo dal lotto di produzione, da incubare alla temperatura di +37 °C per 48 ore, salvo diverse indicazioni. Il lotto di produzione è quindi considerato sterile se nessuna delle piastre incubate presenta crescita microbica, se dovesse esserci anche solo una piastra che presenta lo sviluppo di colonie microbiche, l'intero lotto viene eliminato.

Controllo di Performance: la performance di un terreno colturale viene valutata sulla base di tre parametri principali produttività, selettività e specificità.

Produttività: è la capacità di un terreno colturale di supportare la crescita del microrganismo ricercato.

Selettività: è la capacità degli agenti selettivi presenti nel terreno colturale di inibire parzialmente o completamente la crescita di microrganismi indesiderati.

Specificità: è la capacità del terreno colturale di differenziare i microrganismi sulla base di caratteri biochimici (attraverso cambiamenti di pH con annesso viraggio del colore del terreno per l'utilizzo degli zuccheri, conformazione e colore

⁸ È la misura della capacità di condurre corrente elettrica ed esprime il contenuto in Sali minerali dell'acqua. Tanto più elevata è la concentrazione di ioni disciolti tanto più elevata sarà la conducibilità.

delle colonie batteriche) che consentono di identificare in maniera presuntiva il microrganismo d'interesse.

Gli indici di qualità produttività, selettività e specificità vengono valutati con metodi qualitativi e semi-quantitativi cioè analisi di laboratorio che forniscono una stima della performance del terreno colturale, poiché basate sulla presenza od assenza del microrganismo.

La normativa ISO 11133-2:2011 stabilisce quattro metodi per l'applicazione di queste analisi ideate in base allo stato fisico del terreno colturale ed al supporto in cui sono contenuti cioè liquido in provette o bottiglie, solido (in piastra Petri, provette o bottiglie) o semi-solido in piastra Petri ma approfondirò soltanto le metodiche più usate che sono:

- **Terreni colturali liquidi.**
Seminare 1 o 2 gocce di coltura primaria nel terreno con una pipetta. L'esito atteso sarà positivo se il microrganismo cresce (sviluppo della torbidità), se negativo non sarà evidenziata nessuna torbidità del mezzo.
- **Terreni colturali solidi in piastra.**
Dividere le piastre in quadranti con il pennarello. Strisciare le colture dei ceppi di controllo in linee parallele consecutivamente sui quadranti 1, 2, 3 e 4.
Se il terreno non è selettivo il microrganismo si svilupperà in tutti e quattro i quadranti evidenziando anche la specificità del terreno colturale oltre che la produttività.
I microrganismi utilizzati come controllo della selettività, devono svilupparsi eventualmente solo nel primo o nel secondo quadrante pena l'eliminazione del lotto.

I metodi quantitativi includono tecniche di analisi che forniscono una quantificazione della performance dei terreni colturali poiché basate sul conteggio delle colonie sviluppate nel terreno solido od in base al livello di torbidità del terreno liquido. I metodi quantitativi comparano i risultati ottenuti da due terreni colturali:

- 1°. **Terreno di riferimento (TR):** sono dei terreni colturali nutritivi, non selettivi ad ampio spettro, che permettono lo sviluppo di un numero elevato di microrganismi. I terreni di riferimento previsti dalla normativa sono il Tryptone Soy Agar, Agar Triptone Soia (TSA), per i controlli dei terreni colturali solidi, mentre viene impiegato il Tryptone Soy Broth, Brodo Triptone Soia (TSB) per quelli liquidi.
- 2°. **Terreno test (TT):** terreno da sottoporre ai controlli di qualità, cioè il terreno in esame.

Due sono i metodi più utilizzati il 1°) è la conta batterica totale, il 2°) è la tecnica della diluizione all'estinzione.

La scelta del tipo di metodo e la frequenza di esecuzione viene decisa in base:

- alla modalità operativa prevista dalla normativa nel controllo di qualità del terreno colturale;
- alla quantità e alle tipologie di terreni colturali prodotti giornalmente.

Una volta scelta la modalità operativa ed applicata ai due terreni (riferimento e test), i risultati vengono valutati attraverso l'impiego del rapporto di produttività e del fattore di selettività che forniscono informazioni sulla qualità finale del terreno colturale, cioè stabiliscono se il terreno è qualitativamente accettabile per la distribuzione e se soddisfa i requisiti per l'uso nelle analisi di laboratorio.

4.3 Caso studio

L'esigenza dei laboratori di ottenere terreni colturali che mantengano una qualità accettabile al momento dell'uso è sempre maggiore, infatti gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (II. ZZ. SS.) hanno condotto varie ricerche per la definizione della shelf-life dei terreni colturali (è intesa come il tempo massimo entro la quale un terreno colturale conserva tutte le caratteristiche essenziali per la corretta crescita e caratterizzazione di uno specifico microrganismo). In particolare tratterò un caso studio condotto in una di queste ricerche nello studio della shelf-life di dodici terreni critici aventi cioè una shelf-life minore od uguale ai trenta giorni, ciascuno dei quali è stato prodotto in tre lotti per un totale di 5940 campioni.

Per ciascun terreno in esame sono stati valutati i parametri chimico-fisici e microbiologici del prodotto a partire dal giorno 30 aprile 2003 continuando fino al 10 settembre 2003.

I terreni colturali nel test erano dodici, ma in questo elaborato descriverò i risultati più rilevanti ottenuti da cinque terreni colturali: *Campylobacter* agar (Karmali), *Campylobacter* selective medium, Terreno colturale selettivo per *Campylobacter* (Skirrow), *Bacillus cereus* agar (MYP agar), Xilose lysine deoxycholate medium, Terreno colturale con Xilosio Lisina Desossicolato (XLD).

I metodi di applicati al controllo qualità dei terreni colturali nel progetto sono:

Campionamento: Ad ogni punto di verifica (tabella 4.3) per ciascun lotto di terreno colturale è stata prelevata un'unità campionaria di nove piastre in conformità alle procedure standard previste.

Verifica del calo ponderale e del pH: Ad ogni punto di verifica (tabella 4.3) di ogni terreno venivano pesati mediante delle bilance tecniche allo scopo di valutare la percentuale di calo ponderale, dopodiché veniva misurato il pH in modo da monitorare le variazioni durante il periodo di conservazione. Il valore di calo ponderale del lotto per essere accettabile doveva essere $\leq 5\%$, i terreni colturali

per ottenere la conformità devono mantenere un pH che stia all'interno del range prestabilito dal test rispettivamente pH 7,2 – 7,6.

Punto di verifica	Data	Punto di verifica	Data
T ₁	30/04/2003	T ₇	26/06/2003
T ₂	15/05/2003	T ₈	09/07/2003
T ₃	27/05/2003	T ₉	16/07/2003
T ₄	03/06/2003	T ₁₀	28/07/2003
T ₅	10/06/2003	T ₁₁	26/08/2003
T ₆	17/06/2003	T ₁₂	10/09/2003

Tabella 4.3 Punti di verifica con annessa data di controllo

Verifica della sterilità: ad ogni misurazione sono state incubate nel termostato due piastre per ogni lotto a +21°C per 48 ore e altre due a +36°C sempre per 48 ore in modo da poter monitorare la sterilità del prodotto.

Verifica della produttività: il controllo della produttività è stato eseguito secondo il metodo ecometrico modificato (Figura 4.2): cioè a seguito dell'incubazione di due terreni colturali (terreno test = TT; terreno di riferimento = TR) la produttività viene definita con un punteggio che dipende dal grado di crescita delle colonie. Il metodo ecometrico modificato rientra nei metodi semi-quantitativi per la valutazione della performance dei terreni colturali solidi e consiste nel prelevare con un ansa sterile 1µl di brodocoltura contenente il ceppo di riferimento da inoculare nel TR e nella medesima quantità viene inoculato nel TT.

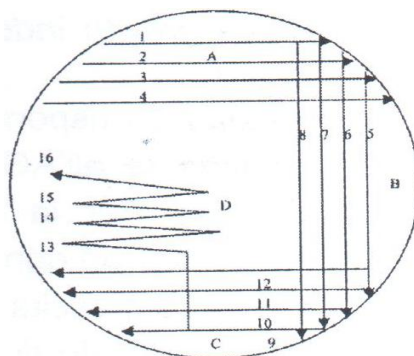


Figura 4.2 Metodo ecometrico modificato

Questa metodica si basa sulla semina per striscio che determina una riduzione esponenziale della carica dell'inoculo, si comincia dunque strisciando quattro linee parallele a distanza di 5mm nei settori A, B e C, mentre per il settore D viene effettuata un'unica strisciata.

Dopodiché i terreni colturali vengono incubati a temperature ed a tempi indicati dalle schede di produzione dei specifici terreni e i risultati ottenuti vengono calcolati con l'indice di produttività che si ottiene, dal rapporto della somma dei punteggi dei singoli strisci che presentano crescita in ambedue i terreni (viene attribuito 1 punto per ogni linea che presenta crescita completa e 0,5 punti ogni linea che presenta crescita per metà lunghezza) come da formula:

$$\text{Indice di produttività} = \frac{C_{\text{Test}}}{C_{\text{Riferimento}}}$$

La qualità del lotto di produzione è giudicata accettabile con indice di produttività $\geq 70\%$.

Risultati: Verifica del calo ponderale (Figura 4.3): Il terreno *Bacillus cereus* agar (MYP agar) non ha mai presentato un calo peso superiore al 5% durante i 180 giorni di test, per quanto riguarda il *Campylobacter* agar (Karmali) il superamento del valore soglia è avvenuto al centoventicinquesimo giorno con un valore di calo ponderale del -5,30%.

Per il *Campylobacter* selective medium (Skirrow), il calo è avvenuto al centoquarantesimo giorno con valori del -5,68% , nel Xilose lysine deoxycholate medium (XLD) il superamento della soglia avviene al centottantesimo giorno con un calo del -6,73%.

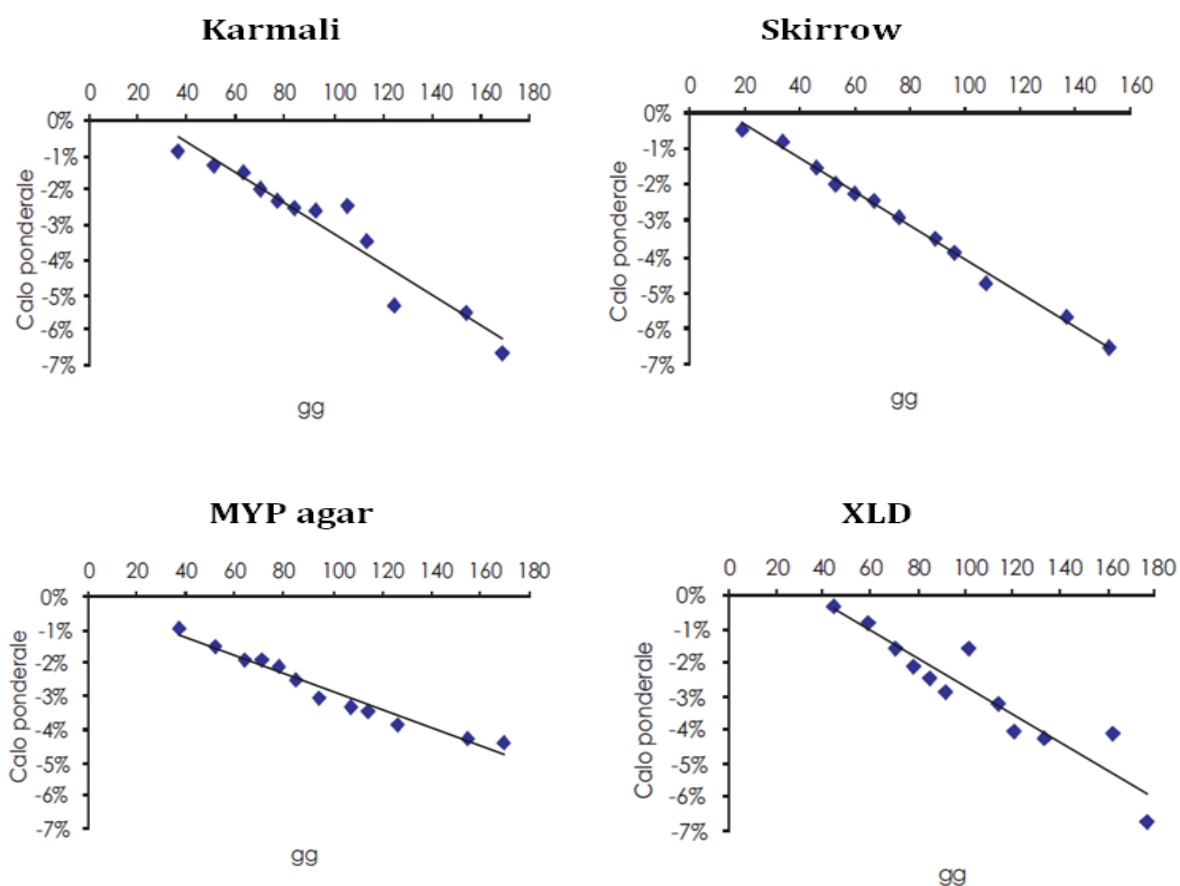


Figura 4.3 Grafici calo ponderale dei terreni culturali solidi in piastre Petri

Verifica del pH (Figura 4.4): durante il periodo di 180 giorni, la media del pH dei tre lotti di *Campylobacter* agar (Karmali) al dodicesimo controllo (T₁₂ = 10/09/2003) si è riscontrato un pH pari a 7,115, appena inferiore al limite di tolleranza inferiore prestabilita da notare che nelle misurazioni precedenti il pH è sempre rimasto all'interno del range di accettabilità .

Per il *Campylobacter* selective medium (Skirrow) nella valutazione effettuata aT₁₁ il valore medio di pH era 7,2 calando progressivamente a pH 7,105 nei successivi sedici giorni cioè al controllo finale, durante l'intera durata del test i lotti di Skirrow hanno mantenuto un valore medio di pH sempre al limite della soglia di tolleranza inferiore probabilmente dovuto al fatto che nella composizione del terreno colturale è prevista l'aggiunta di sangue equino defribinato, mentre per lo Xilose lysine deoxycholate medium (XLD) l'andamento della media (linea blu) dei valori di pH sono rimasti all'interno del range di tolleranza stabiliti a parte il calo evidenziato nei controlli finali aT₁₁-T₁₂ dove il pH è calato progressivamente fino a valori di pH 7,128. I valori medi di pH dei tre lotti di *Bacillus cereus* agar (MYP agar) in tutta la durata dell'esperimento sono rimasti sempre all'interno dei limiti di tolleranza stabiliti.

Verifica della sterilità: le piastre prelevate in tutti e dodici i controlli sono risultate sterili confermando ai lotti di ciascun terreno colturale la sterilità del prodotto.

Verifica della produttività: in tutti i terreni colturali in esame, fino all'undicesimo controllo si è rilevata una elevata produttività con valori oltre il 70%.

Al dodicesimo controllo uno o due dei tre lotti esaminati per ciascun terreno colturale hanno presentato valori di produttività inferiore al 45 %.

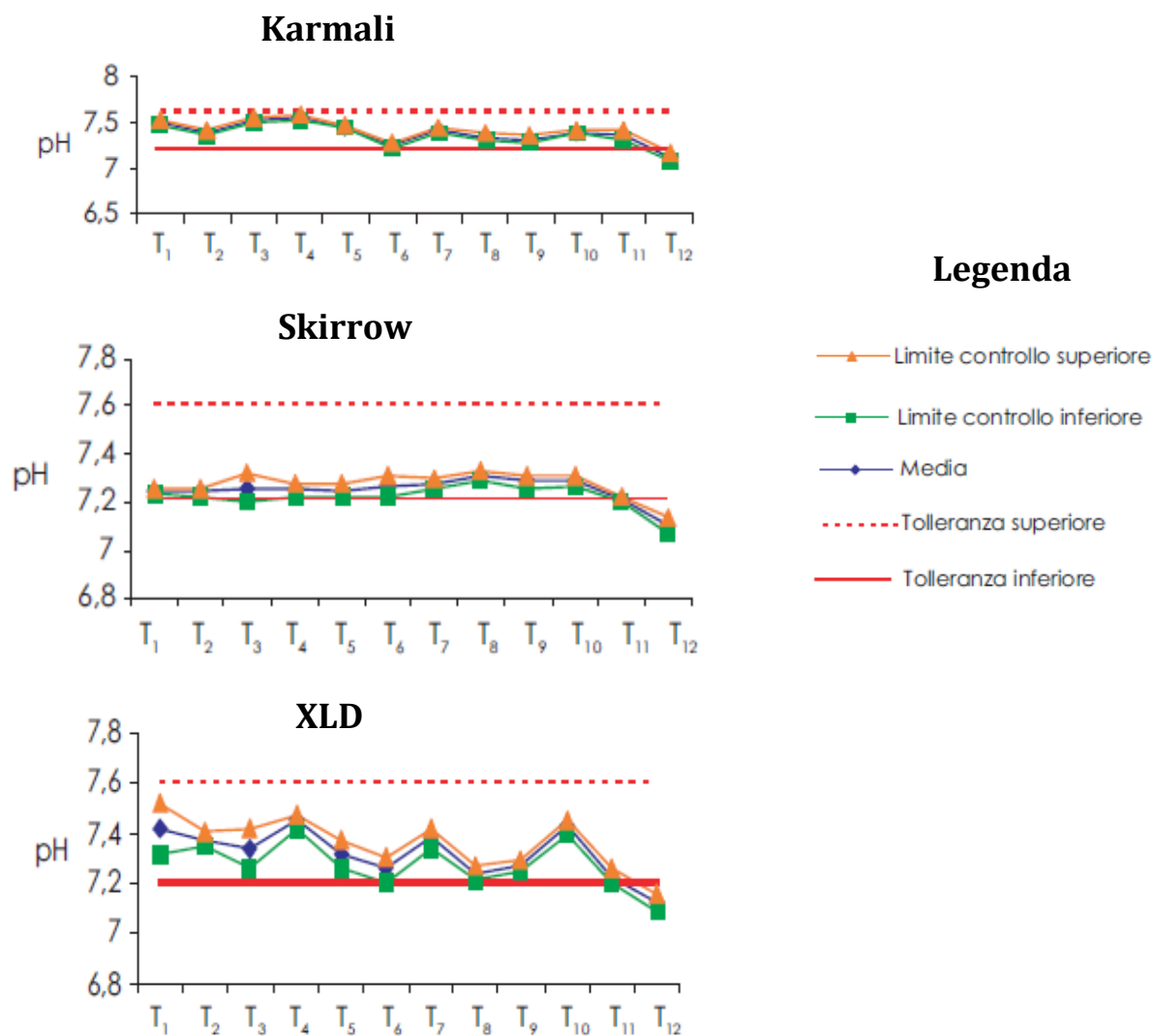


Figura 4.4 Valutazione andamento del pH dei terreni colturali con valori al di fuori dei limiti di tolleranza

L'analisi dei parametri come il calo ponderale, pH, sterilità e produttività per la verifica della shelf-life dei terreni colturali oggetto della ricerca condotta dagli Istituti Zooprofilattici Sperimentali hanno permesso di ricavare dei tempi di validità maggiori riportati nella tabella 4.3.

In questa tabella vengono riportate tre tipologie di shelf-life:

- 1)codificata = è il valore di shelf-life assegnato dal produttore o dalla normativa al terreno colturale.
- 2)osservata = è il valore di shelf-life in cui tutti e quattro i parametri valutati rientravano nei range stabiliti.
- 3)assegnata = è il valore di shelf-life assegnato al terreno colturale dal team di ricercatori degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali.

Terreno colturale	Shelf-life in giorni		
	Codificata	Osservata	Assegnata
Karmali	3	113	90
Skirrow	5	108	90
MYP agar	2	155	120
XLD	5	162	90

Tabella 4.3 Valori di shelf-life dei terreni colturali esaminati.

Nella tabella 4.3 si può osservare una notevole differenza tra la shelf-life codificata e quella assegnata alla fine della sperimentazione, infatti si evidenzia come il MYP agar con shelf-life di soli due giorni mantenga le sue caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche inalterate per oltre 150 giorni come riportato in tabella. La risposta a questa differenza tra le due shelf-life, viene fornita dalla necessità dei laboratori pubblici accreditati preposti al controllo ufficiale dei prodotti alimentari di ottenere dalle analisi, risultati attendibili, ripetibili ed accurati, tramite l'utilizzo di terreni colturali con caratteristiche nutrizionali e tecnologiche qualitativamente accettabili, infatti le shelf-life assegnate ai mezzi di crescita nel caso studio degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali fanno riferimento ai migliori standard di produzione e conservazione dei terreni colturali, dimostrando che se si lavora in modo corretto in relazione con le normative vigenti in materia di qualità dei terreni colturali, si ha una ricaduta estremamente positiva in termini di organizzazione del lavoro (migliore gestione delle risorse di magazzino e stoccaggio), abbassamento dei costi di produzione nell'attività quotidiana dei laboratori (corretta gestione e conservazione delle scorte di prodotto finito, riduzione degli sprechi dovuti agli errori).

Quindi i produttori dovendo garantire la funzionalità ed attendibilità dei terreni colturali anche in situazioni di abuso termico, noncuranze durante la preparazione ed altro, per queste motivazioni assegnano una shelf-life così ridotta ai mezzi di crescita, spiegando la differenza tra la shelf-life codificata ed assegnata.

Sulla base dei limiti di shelf-life osservati per ciascun terreno di coltura, i ricercatori dell'Istituto Zooprofilattico hanno ritenuto opportuno stabilire una nuova shelf-life rispettivamente di novanta giorni per *Campylobacter* agar (Karmali), *Campylobacter* selective medium (Skirrow) e Xilose lysine deoxycholate medium (XLD), mentre per il *Bacillus cereus* agar (MYP agar) è stata assegnata una shelf-life di ben 120 giorni, inoltre la riduzione temporale fra la shelf-life osservata e la shelf-life assegnata costituisce un ulteriore elemento di sicurezza nei confronti di errori che si possono verificare nello stoccaggio e/o nella conservazione, che possono compromettere l'efficienza del terreno stesso.

Capitolo 5

Conclusione

Adottare un sistema di gestione della qualità in un laboratorio produzione terreni colturali significa assicurare che il processo produttivo impiegato, rispetti gli standard operativi previsti dalle norme internazionali e che i risultati ottenuti mediante l'impiego dei mezzi di crescita nelle analisi microbiologiche siano affidabili, riproducibili ed accurati, garantendo così un'elevata attendibilità dei dati ottenuti in laboratorio.

Attualmente in Italia a dicembre 2010 risultano operanti 4 372 143 imprese, di cui solamente il 3% pari a 158 017 sono certificate secondo gli standard ISO (tabella 5.1).

Da questo dato si può comprendere che non è facile per un'azienda ottenere la certificazione e/o l'accreditamento, è però comunque un'attività positiva, se si considerano gli effetti sui risultati finali (abbassamento dei costi aziendali, efficiente organizzazione lavorativa, spreco limitato ed altri) come dimostrato nel caso degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali.

I dati raccolti nella tabella 5.1 sono forniti dall'Istituto nazionale di statistica (Istat) e da ACCREDIA cioè l'ente unico di accreditamento in Italia previsto dal Reg. Europeo n° 765 del 9 luglio 2008 che dal primo gennaio 2010 è applicato per l'accreditamento e la vigilanza del mercato in tutti i paesi dell'Unione Europea, perciò ogni nazione europea è vincolata ad avere il suo ente unico che è responsabile per l'accreditamento delle imprese a livello nazionale in conformità agli standard della serie ISO.

Tipologie di certificazione	2010	2011
SGQ - Sistemi di gestione per la qualità (ISO 9001, ISO 13485 ed altre)	125 447	135 383
SGA - Sistemi di gestione ambientale (ISO 14001)	14 787	15 588
SCR - Sistemi di gestione per la salute e sicurezza sul lavoro(OHSAS 18001)	3 829	6 269
SSI - Sistemi di gestione per la sicurezza delle informazioni (ISO 27001)	288	359
ITX - Sistemi di gestione per i servizi informatici (ISO 20000)	4	20
FSM - Sistemi di gestione per la sicurezza alimentare (ISO 22000)	300	398
Totale	144 665	158 017

Tabella 5.1 Distribuzione delle certificazioni delle aziende italiane in funzione alla tipologia di normativa applicata negli anni 2010 e 2011.

Nella tabella 5.1 il dato che emerge principalmente è che la certificazione più attuata è quella che riguarda l'implementazione di un sistema di gestione per la qualità infatti 135 383 imprese nel 2011 risultano attuarlo, da notare inoltre che

anche nell'anno precedente l'SGQ risulta essere il sistema più attuato dalle aziende italiane.

Su 158 017 aziende certificate in Italia risultano **accreditate** nel 2011 più di 1309 soggetti ripartiti secondo la tabella 5.2 in :

- 974 laboratori di prova e laboratori di prova per la sicurezza degli alimenti di cui il 24% (234 unità) è costituito da laboratori di prova pubblici ;
- 171 organismi di certificazione e ispezione;
- 164 laboratori di taratura.



Tabella 5.2 Evoluzione degli accreditamenti per le diverse tipologie di laboratori.

Nonostante la crisi economica, si evidenzia nell'ultimo decennio una tendenza all'aumento del numero dei laboratori di prova accreditati.

In particolare i laboratori di prova e laboratori di prova per la sicurezza degli alimenti sono aumentati di 96 unità rispetto al 2010 che contava 878 accreditamenti. Questo è dovuto principalmente all'abbassamento dei costi di accreditamento e mantenimento dello stesso effettuato da ACCREDIA, registrando così:

- un aumento del numero di richieste di accreditamento pervenute.
- un aumento degli organismi di controllo ed ispezione dovuto dal maggior numero di controlli da effettuare per la richiesta, il rinnovo ed il mantenimento dell'accREDITAMENTO.

Anni sfavorevoli sono invece per i laboratori di taratura i quali sono diminuiti di 13 unità negli ultimi anni a discapito delle 177 unità registrate dal 2007 al 2009.

Secondo una ricerca a livello nazionale (figura 5.1) sui settori laboratoristici accreditati effettuata da ACCREDIA nel 2011, risulta che su 974 unità accreditate il

settore predominante è quello chimico con una percentuale del 44% (428), mentre il settore microbiologico con una percentuale del 36% si trova al secondo posto con 350 unità, per quanto riguarda gli altri settori, i laboratori accreditati nell'ambito enologico sono attualmente 78 e costituiscono circa l'8% confermandosi al terzo posto come settore di accreditamento.

Un settore emergente nell'ambito dell'accREDITAMENTO è sicuramente quello della biologia molecolare con 29 laboratori accreditati che costituiscono il 3% del totale, dato che rivela la necessità di accreditare queste metodiche innovative.

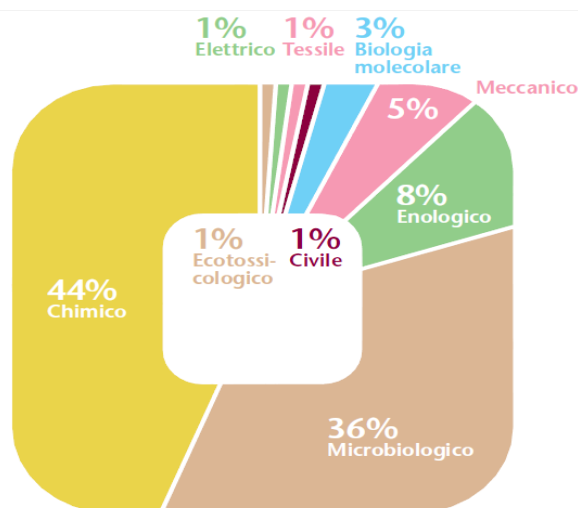


Figura 5.1 Valori in percentuale dei settori laboratoristici accreditati. Dati ACCREDIA 2009.

In questo elaborato viene solamente accennato l'aspetto economico dell'applicazione di un sistema di gestione per la qualità anche se meriterebbe un adeguato approfondimento. Quindi fare qualità per un laboratorio rappresenta certamente dei costi che sono suddivisibili principalmente in:

Costi Interni

Sono i costi sostenuti dall'azienda per implementare il sistema di gestione per la qualità e variano in funzione agli investimenti effettuati. In questa categoria troviamo:

- ✚ **Costi di prevenzione:** sono quei costi che riguardano l'eliminazione delle cause che possono condurre al mancato raggiungimento dei livelli di qualità prefissati. In questa categoria vi sono i costi sostenuti dall'azienda per la formazione ed addestramento del personale, ammodernamento degli impianti e dei macchinari.
- ✚ **Costi di ispezione e controllo:** sono attuati per verificare se la qualità del prodotto raggiunge i livelli prefissati, rientrano in questa categoria le prove e di controlli effettuati sui materiali provenienti dai fornitori, i controlli di qualità chimico-fisico e microbiologico dei terreni culturali.
- ✚ **Costi dei difetti:** dovuti al mancato raggiungimento dei livelli di qualità di prodotto prefissati e rientrano in questa categoria i costi dovuti agli

scarti di produzione, alle rilavorazioni di prodotto, agli errori effettuati durante il ciclo produttivo, alla mancata accettazione delle materie prime provenienti dai fornitori.

Costi esterni

Sono i costi sostenuti dall'azienda per la richiesta, il rinnovo, l'estensione e il mantenimento dell'accreditamento e sono suddivisibili in:

- Presentazione Domanda di Accreditemento	1.000 Euro + IVA
- Presentazione Domanda di Rinnovo	1.000 Euro + IVA
- Presentazione Domanda di Estensione	500 Euro + IVA
- Quota annua di Mantenimento	1.500 Euro + IVA

Per agevolare il mantenimento dell'accreditamento da parte dei piccoli laboratori (intesi come laboratori che non hanno più di 8 dipendenti, un fatturato totale non superiore a 400 000 Euro e non sono connessi ad imprese industriali), la quota è ridotta a 1.000,00 Euro + IVA annui.

Da aggiungere a questi importi i costi dovuti alle verifiche ed ai controlli effettuati dagli ispettori incaricati che sono:

- (826,00 euro + IVA) per giorno/uomo.

Per giorno/uomo s'intende l'importo determinato moltiplicando il numero di giornate impiegate dagli ispettori per espletare gli incarichi assegnati per la quota fissa di 826,00 euro + IVA perciò l'importo totale varia in funzione:

- ✚ alla tipologia e al numero di prove oggetto della richiesta di accreditamento;
- ✚ al numero degli Ispettori incaricati per l'accreditamento dell'azienda;
- ✚ ai giorni di ispezione effettivi.

Bibliografia

Anonimo 1998. Culture Media Ingredients. In The Difco Manual, ed. Anonimo, 6-9. Detroit : Difco Laboratories Division of Becton Dickinson and Company.

Bridson E. Y. 1998. The OXOID MANUAL. Basingstoke : OXOID Limited.

Budroni M. e Mannazzu I. 2007. La nutrizione microbica. In Microbiologia generale e agraria, ed. Biavati B. e Sorlini C. , 158-166. Milano: C. E. A. Casa Editrice Ambrosiana.

Castellana M. 2008. Studio della shelf-life di terreni per microbiologia alimentare. Relatore Alberghini L. Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Facoltà di Agraria, di Medicina e Chirurgia e di Medicina Veterinaria, Università degli studi di Padova , Legnaro.

Goffredo E., La Salandra G., Adriano D., Cappuccella M., Cardamone C., Grimaldi M., Orefice L., Pisanu M., Salinetti A.P. e Pedarra C.. 2006. Validazione della shelf-life di terreni colturali: metodologia applicata ad un terreno solido selettivo – Agar Oxford. VIII Congresso Nazionale Società Italiana di Diagnostica di Laboratorio Veterinaria (S.I.Di.L.V.). In atti S.I.Di.L.V., 193-194, Perugia, S.I.Di.L.V., 9-10 novembre.

Goffredo E., La Salandra G., Adriano D., Cappuccella M., Di Noto A.M., Grimaldi M., Orefice L., Pisanu M., Bogdanova T. e Pedarra C.. 2006. Validazione della shelf-life di terreni colturali: metodologia applicata ad un terreno liquido selettivo – Brodo Rappaport Vassiliadis Soia. VIII Congresso Nazionale Società Italiana di Diagnostica di Laboratorio Veterinaria (S.I.Di.L.V.). In atti S.I.Di.L.V., 195–196, Perugia, S.I.Di.L.V., 9-10 novembre.

Manachini P. L. 2007. Breve storia della microbiologia. In Microbiologia generale e agraria, ed. Biavati B. e Sorlini C. , 6-7. Milano: C. E. A. Casa Editrice Ambrosiana.

Massa S. 2007. Il controllo dei microrganismi. In Microbiologia generale e agraria, ed. Biavati B. e Sorlini C. , 49-51. Milano: C. E. A. Casa Editrice Ambrosiana.

Montefusco R. 1995. Certificare il sistema qualità. Torino:ISED.

Ronald M. A. 2006. Handbook of microbiological media for the examination of food. Boca Raton: CRC Press Taylor and Francis Group

Ulisse S. , Peccio A. , Orsini G. e Di Emidio B. 2006. Studio della “shelf-life” di terreni critici. Veterinaria italiana 42 (3): 225-235.

UNI EN ISO 9000. 2005. Definizioni e dizionario dei termini.

UNI EN ISO 9001. 2008. Requisiti dei sistemi di gestione per la qualità.

UNI EN ISO 9004. 2009. Linee guida per la gestione della qualità delle aziende.

UNI EN ISO 11133-1. 2009. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on preparation and production of culture media — Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory.

UNI EN ISO 11133-2. 2011. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on preparation and production of culture media — Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media.

Sitografia

Accredia. 2013. L'ente italiano di accreditamento. <http://www.accredia.it/>

Istat. 2013. Istituto nazionale di statistica. <http://www.istat.it/it/>

Istituto Superiore di Sanità. 2013. Rapporti ISTISAN.
<http://www.iss.it/publ/rapp/index.php?lang=1&tipo=5&anno>

Laboratory News. 2013. History of agar plate.
<http://www.labnews.co.uk/features/history-of-the-agar-plate/>

Oxoid Limited. 2001-2013. Technical support. <http://www.oxoid.com/>

QualitiAmo. 2013. UNI EN ISO 9001:2008. <http://qualitiamo.com/index.htm>

Università degli studi di Cassino e Lazio Meridionale. 2012. Il sistema qualità.
<http://www3.eventi.unicas.it/Competitivita-del-settore-lapideo/Parte-II-il-Sistema-Qualita>