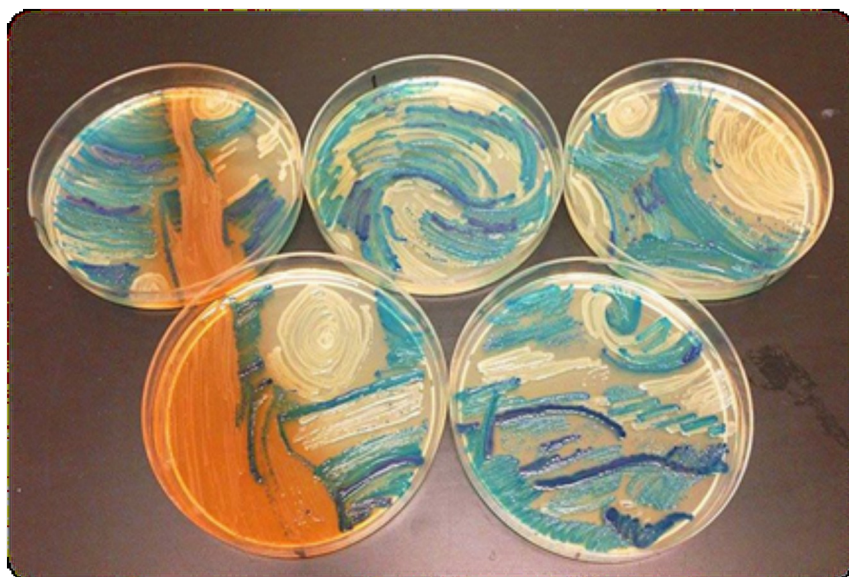




IL CONTROLLO DI QUALITÀ SECONDO LA ISO 11133:2014



Selene Marozzi
selene.marozzi@izslt.it

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, M. Aleandri Roma,
06 settembre 2016



LA QUALITÀ

492 a.C. in una tavoletta di argilla babilonese un gioielliere garantì che uno smeraldo non si sarebbe staccato dal castone per 20 anni e si impegnava a corrispondere, in caso contrario, un'indennità all'acquirente.

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 concetto di

Qualità

QUALITÀ DI
PRODOTTO

QUALITÀ DI
PROCESSO



NORMA
EUROPEA

Microbiologia di alimenti, mangimi per animali e acqua
Preparazione, produzione, immagazzinamento e prove
di prestazione dei terreni colturali

UNI EN ISO
11133

LUGLIO 2014

UNI:

Ente Nazionale Italiano di Unificazione: un'associazione privata riconosciuta dallo Stato e dall'Unione Europea (Elenco degli organismi nazionali di normazione ai sensi dell'articolo 27 del regolamento (UE) n. 1025/2012), che dal 1921 elabora e pubblica norme tecniche volontarie



EN:

sigla che designa le norme di unificazione emesse dal Comitato Europeo di Normazione (CEN). Il CEN 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



ISO:

Organizzazione internazionale per la normazione (in inglese International Organization for Standardization) è la più importante organizzazione a livello mondiale per la definizione di norme tecniche.





NORMA
EUROPEA

Microbiologia di alimenti, mangimi per animali e acqua
Preparazione, produzione, immagazzinamento e prove
di prestazione dei terreni colturali

UNI EN ISO
11133

LUGLIO 2014

1



Preparazione,
produzione,
immagazzinamento

2

prove di prestazione



3

dei terreni colturali





3

Terreni colturali

la norma specifica i requisiti per la preparazione dei terreni colturali per l'analisi microbiologica degli alimenti dei mangimi, dell'acqua ad uso umano e dei campioni provenienti dagli ambienti di produzione dei medesimi



tuttavia.....

I requisiti della norma sono applicabili a tutti i terreni per uso microbiologico così come i termini correlati all'assicurazione della qualità definiti nella stessa



La classificazione dei Terreni secondo la ISO 11133:2014

CLASSIFICAZIONE IN BASE ALLA COMPOSIZIONE:

- 1) terreno chimicamente definito
- 2) terreno chimicamente indefinito o parzialmente indefinito
- 3) terreno fluorogenico o cromogenico

CLASSIFICAZIONE IN BASE ALLO STATO FISICO:

- 1) liquidi
- 2) solidi e semisolidi

CLASSIFICAZIONE IN BASE ALL'USO:

- 1) terreno di trasporto
- 2) terreno di conservazione
- 3) diluente o terreno per sospensione
- 4) terreno di rivitalizzazione
- 4.1-terreno selettivo di arricchimento
- 4.2-terreno non selettivo di arricchimento
- 5) terreno di isolamento
 - 5.1- terreno selettivo di isolamento
 - 5.2- terreno non selettivo di isolamento
 - 5.3- terreno selettivo fluorogenico o cromogenico
- 6) terreno differenziale
- 7) terreno di identificazione
- 9) terreno per conta
- 9) terreno di conferma
- 10) terreno contenente sostanze neutralizzanti
- 11) terreno per usi molteplici
- 12) Terreno di riferimento

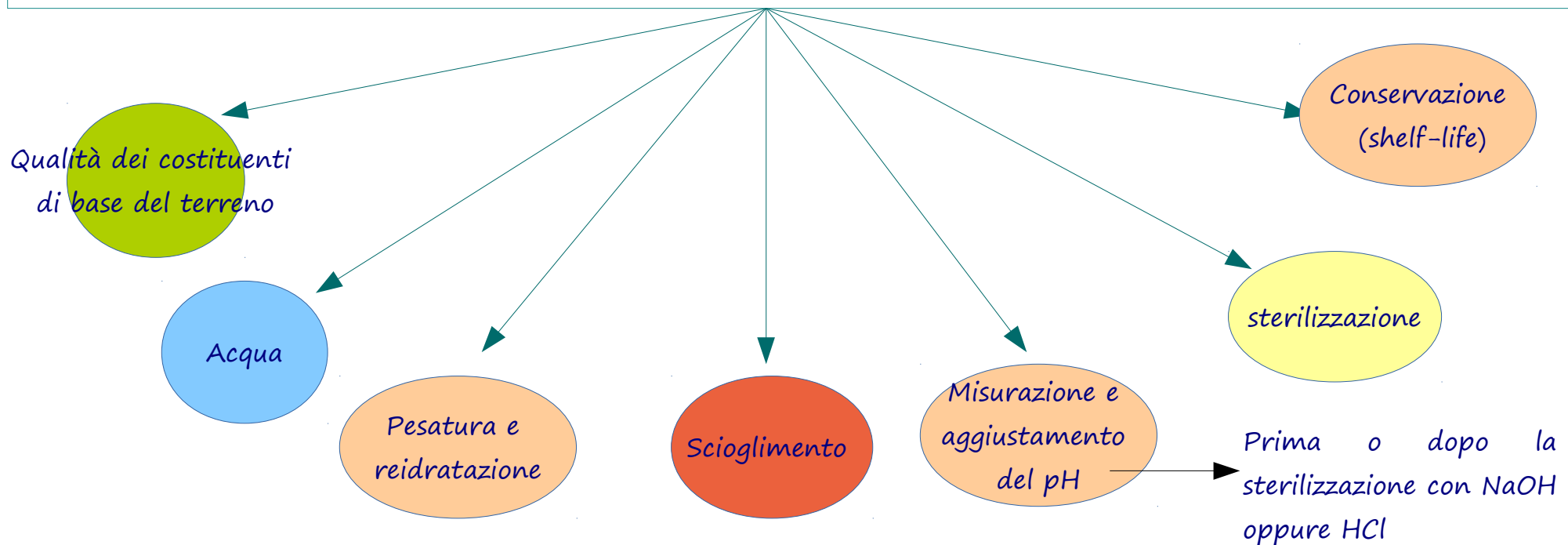
Two other factors to consider when choosing growth media are whether the media is defined or undefined. Defined media consist of components that are all chemically defined. They are rarely encountered in the microbiology laboratory. Most media are undefined. Undefined media are usually prepared from digests of animal or plant proteins, and as such do not have a defined chemical formula. These media are usually tested for growth with a small, specific battery of microorganisms, prior to release for sale by the manufacturer. This can sometimes result in lot-to-lot variations in growth patterns for organisms that are not found on the manufacturer's quality control testing battery of microorganisms. If researchers are using an organism not being tested by the manufacturer, it is always a good idea to test any new lots of media with their own battery to determine if they are suitable.




1 Preparazione, produzione,

immagazzinamento

Preparazione e produzione: “la preparazione accurata dei terreni di coltura è uno degli steps fondamentali per assicurare l'integrità dell'esame microbiologico e ad essa deve essere data la massima attenzione”





Conservazione
(shelf-life)

A 4°C generalmente (ma la ISO consiglia studi per determinare il periodo di conservazione):

- 1) 2-4 settimane per piastre
- 2) 3-6 mesi bottiglie e provette





Preparazione dei terreni per l'uso

Scioglimento dei terreni solidi:

- ⇒ “RISCALDAMENTO in bagnomaria o grazie ad altri metodi che consentono un identico meccanismo”
- ⇒ “i terreni che sono stati **AUTOCLAVATI** devono essere riscaldati per un tempo minimo al fine di mantenerne integra la qualità ”
- ⇒ “i terreni, una volta **SCIOLTI** possono essere mantenuti in bagnomaria a 47/50°C per non più di 4 ore”



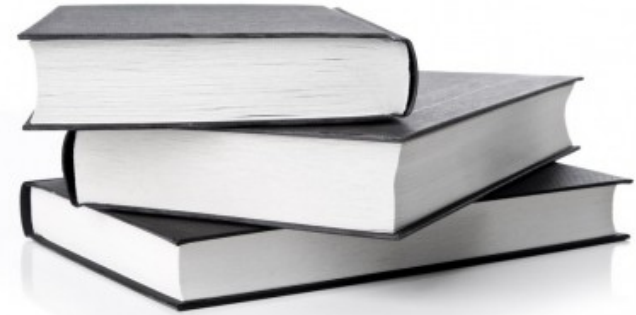
3 Prove di prestazione dei terreni

Il cuore della ISO 1133:2014 (da pag 10 a pag 88.....)





Tre grandi capitoli:



1) I MICRORGANISMI UTILIZZATI NEI TEST DI
VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCE

2) IL CONTROLLO DI QUALITÀ ED I TEST DI
PERFORMANCE SUI TERRENI

3) I METODI PER LA VALUTAZIONE DELLE
PERFORMANCE

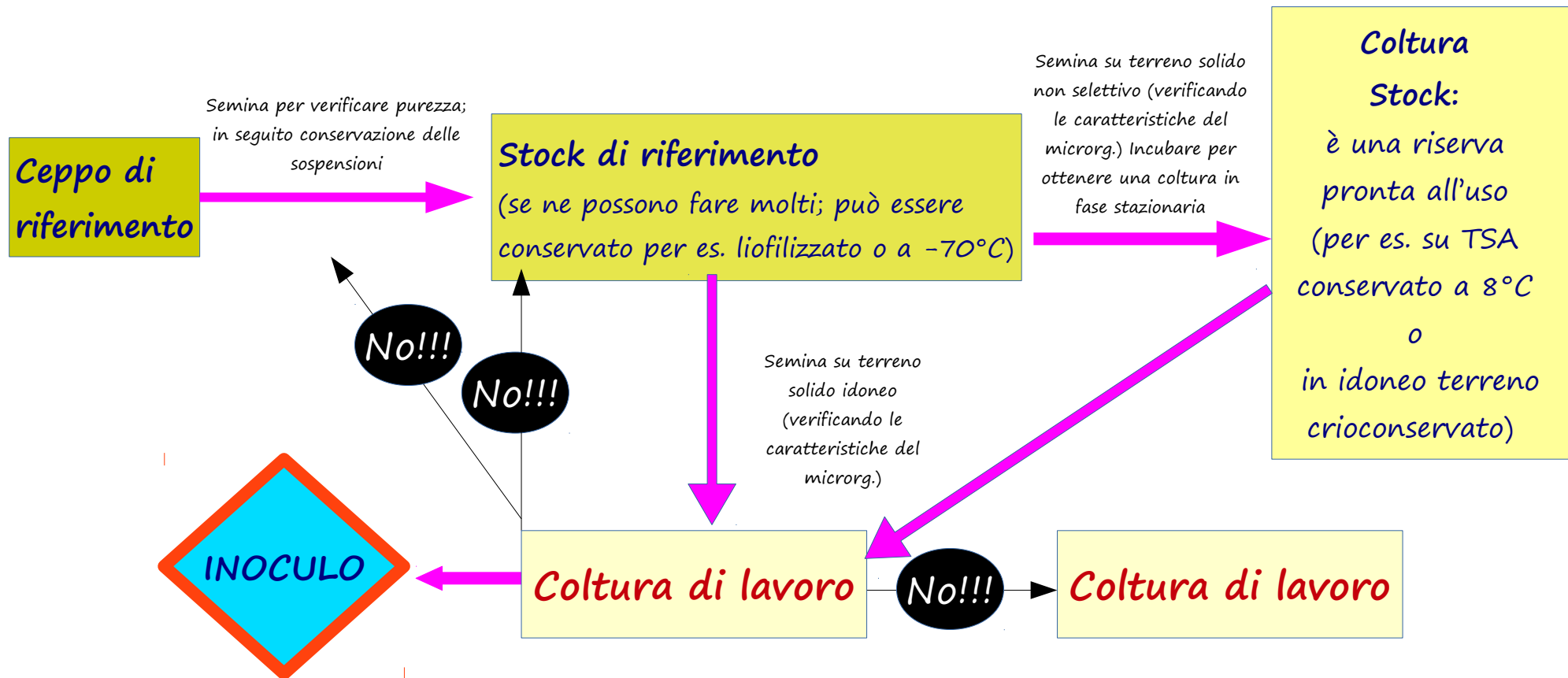


1) I MICRORGANISMI UTILIZZATI NEI TEST DI VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCE

1) Selezione dei microrganismi:

- a) microrganismi da collezioni di riferimento (ATTC; WDCM);
- b) microrganismi ben caratterizzati dal laboratorio preferibilmente isolati da alimenti o acqua;

2) Conservazione e mantenimento dei microrganismi





2) IL CONTROLLO DI QUALITÀ ED I TEST DI PERFORMANCE SUI TERRENI



1) *Controlli di qualità chimico fisici: il terreno deve corrispondere agli standard chimico fisici dichiarati (aspetto, colore, omogeneità, consistenza, volume di riempimento o spessore, umidità, pH)*

2) *Controlli microbiologici:*

2.1) *Sterilità*

2.2) *Controlli microbiologici delle performance (continua...)*



.....Controlli microbiologici delle performance: punti salienti



Eseguire tests quantitativi sui terreni usati per enumerazione e nel caso della valutazione di una nuova “lavorazione” o di un nuovo terreno



Tutti i lotti prodotti devono essere sottoposti a controllo!!!! La numerosità campionaria deve essere rappresentativa del lotto



L'utilizzatore deve effettuare controlli per verificare che il terreno dopo lo stoccaggio, il trasporto, la manipolazione non abbia subito delle variazioni. La frequenza deve essere determinata dal laboratorio



Per i terreni con supplemento provvedere a verificare i registri di produzione o effettuare un test qualitativo



3) METODI PER LA VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCE

Metodi per i terreni solidi

- a) Metodi per i test quantitativi
- b) Metodi per i tests qualitativi



Metodi per i terreni liquidi

- a) Metodi per i test quantitativi (metodo delle provette per le performance dei terreni di arricchimento o metodo della diluizione all'estinzione)
- b) Metodi per i tests qualitativi:
 - b.1) Metodo per la valutazione delle performance dei terreni liquidi selettivi
 - b.2) Metodo della provetta singola (torbidità)





Metodi per i terreni solidi

Metodi per i terreni liquidi

-Produttività
-Selettività
-Specificità





Produttività

“La produttività è il livello di recupero di un microrganismo target in un terreno di coltura in condizioni definite”

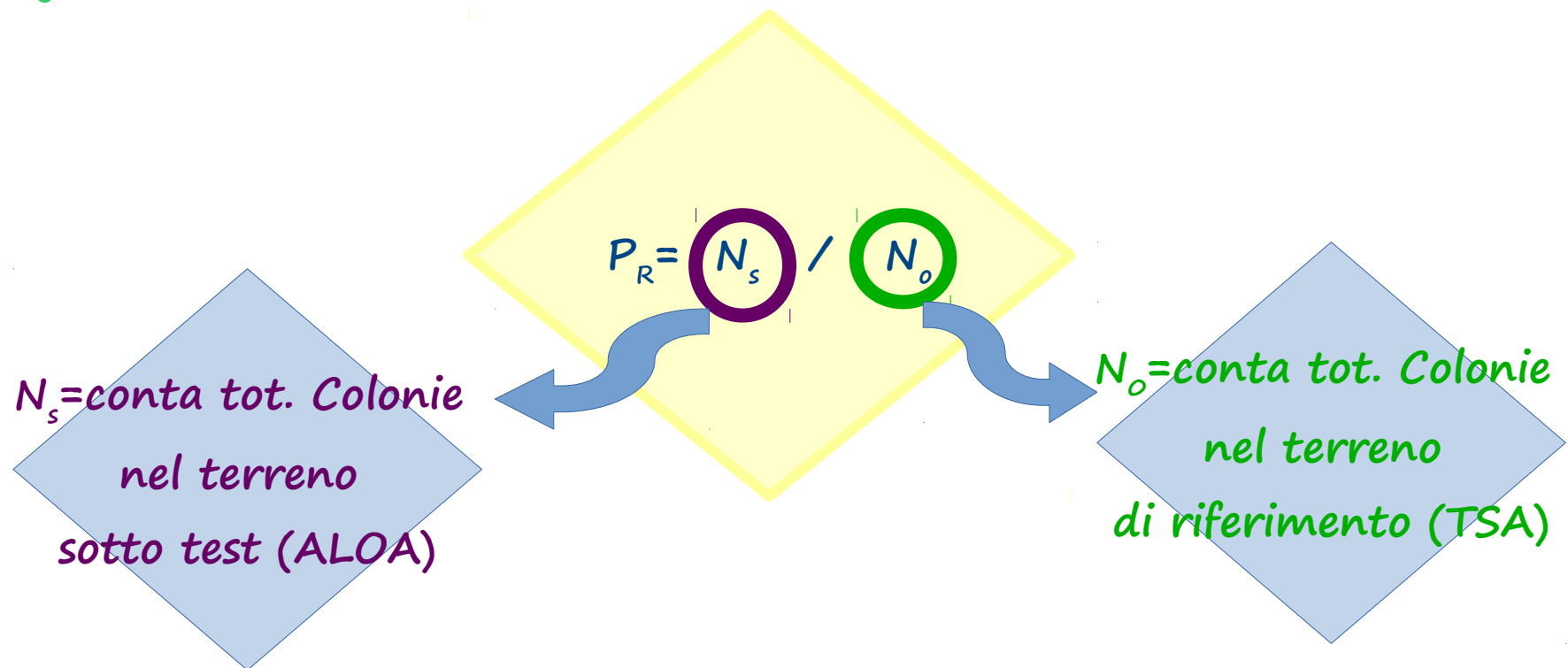




COME SI ESPRIME MATEMATICAMENTE??????

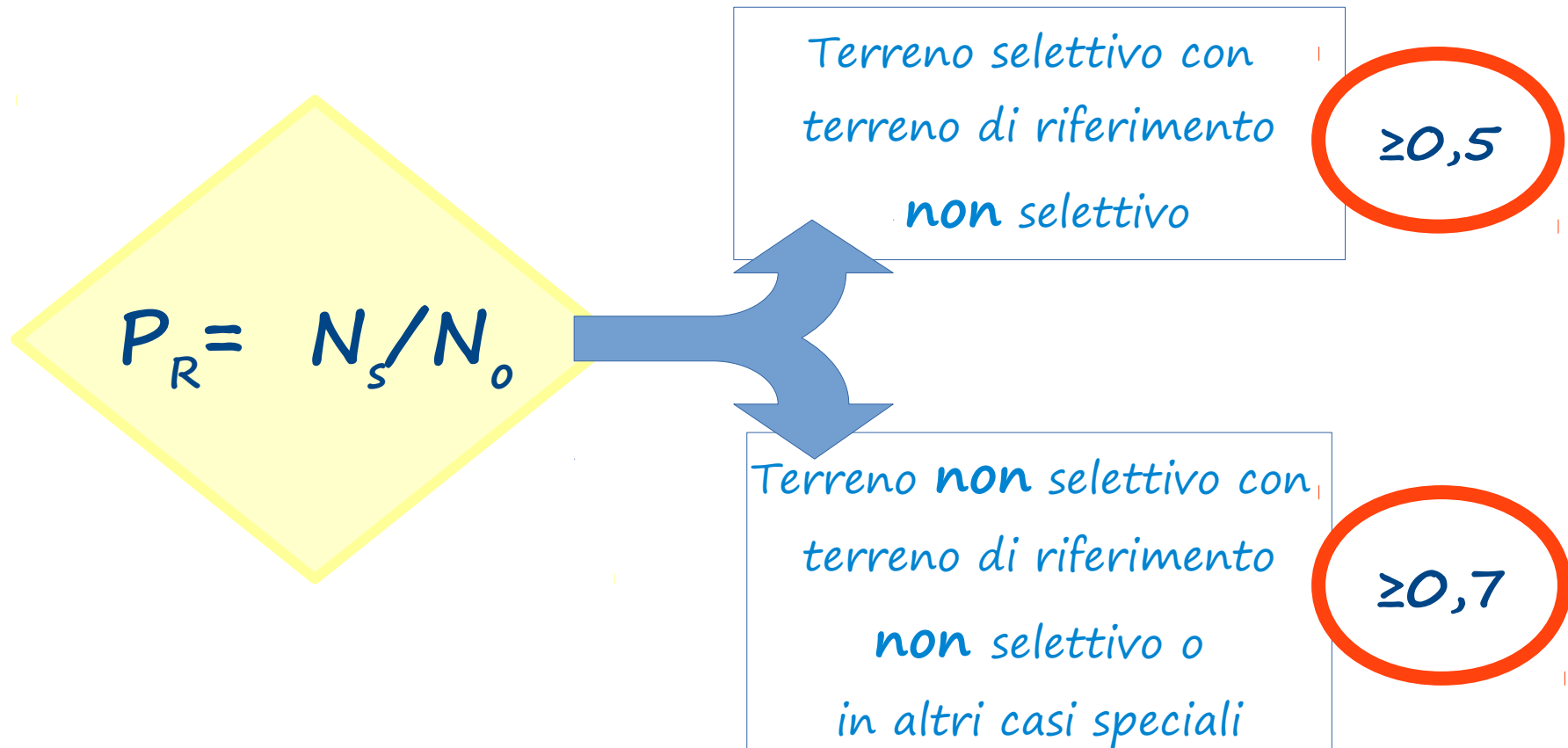
Nel caso dei test quantitativi su terreni solidi la produttività è un **RAPPORTO** ovvero è il risultato ottenuto dal confronto tra il recupero di microrganismo target seminato:

- 1) su un **TERRENO SOTTO TEST** (può essere selettivo o non selettivo)
- 2) su un **TERRENO DI RIFERIMENTO** (ovvero **GENERALEMNETE** un terreno generico per microbiologia non selettivo come il TSA)





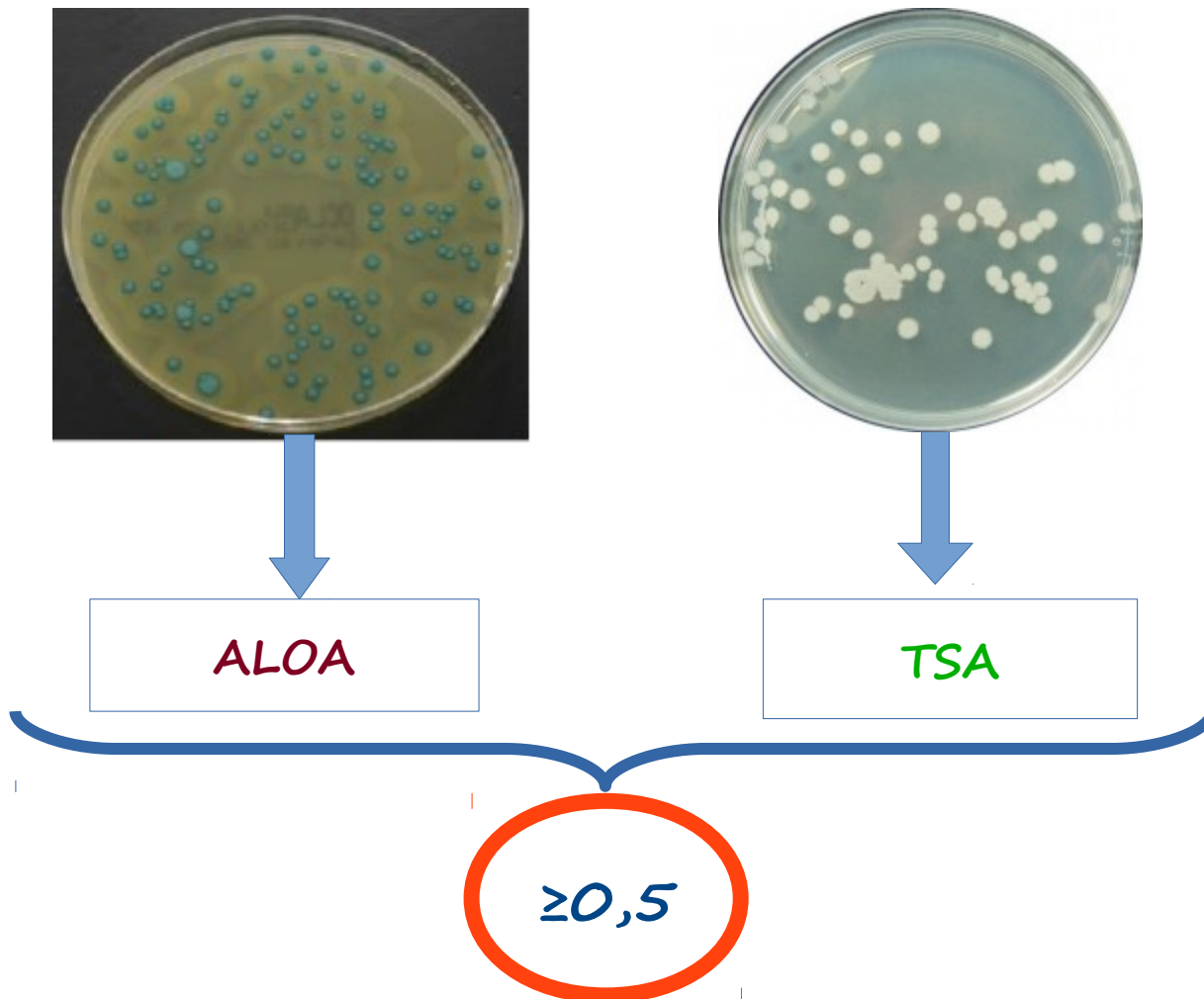
Per i terreni solidi valutati per le performance con test quantitativi: sono considerati valori adeguati di produttività:





Esempio:

Listeria monocytogenes ATCC™ 13932 in ALOA dopo incubazione 44 ± 4 h a 37°C ed in TSA dopo incubazione 44 ± 4 h a 37°C





Nel caso dei tests qualitativi su terreni solidi o liquidi la produttività NON viene calcolata come rapporto ma in termini di crescita del microrganismo target nel terreno sotto test ed è quindi, espressa in modo qualitativo o mediante l'assegnazione di un ranking (per esempio buona torbidità e gas nei tubi di durham oppure >10 colonie oppure buona crescita, 2 ovvero buona crescita)

Esempio:

Listeria monocytogenes ATCC™ 13932 in ALOA dopo incubazione 44 ± 4 ORE A 37 ± 1 °C



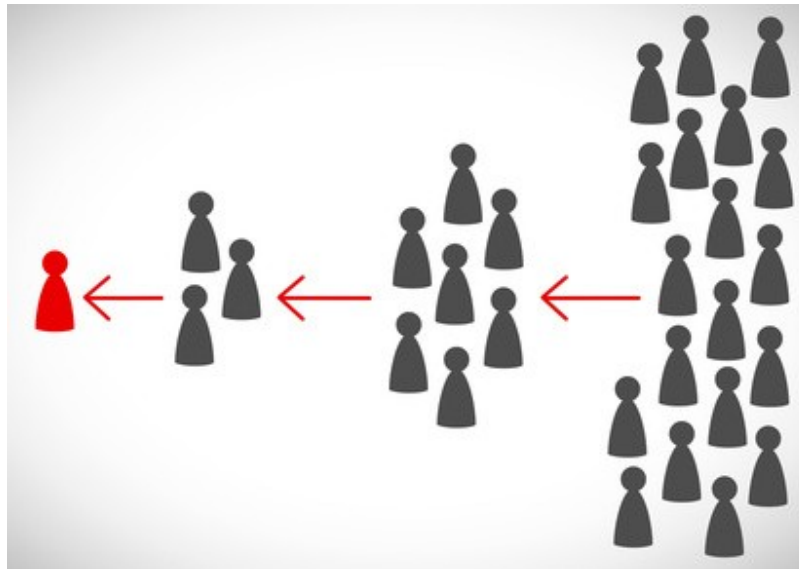
ALOA

Buona
crescita (2)



Selettività

“E’ il grado di inibizione di un microrganismo non target in un terreno selettivo in condizioni definite”

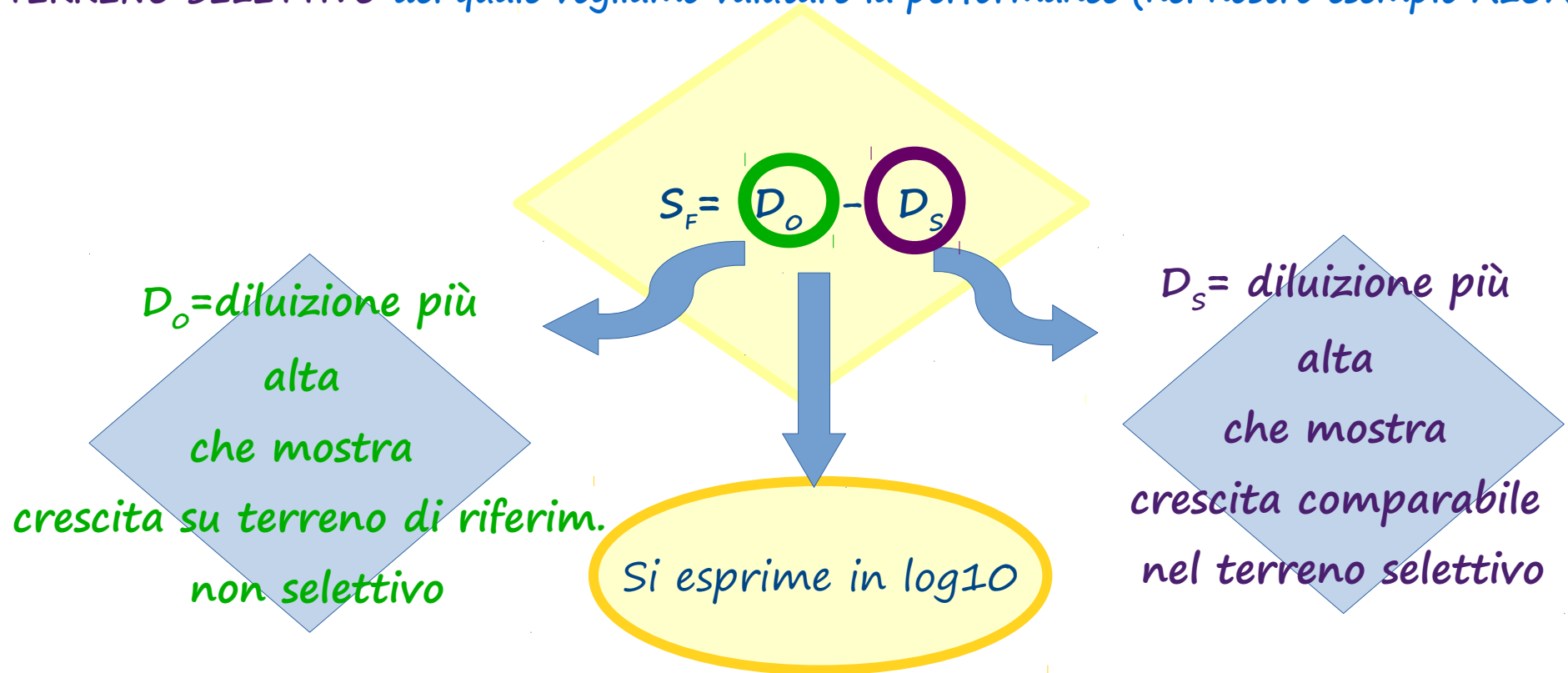




COME SI ESPRIME MATEMATICAMENTE??????

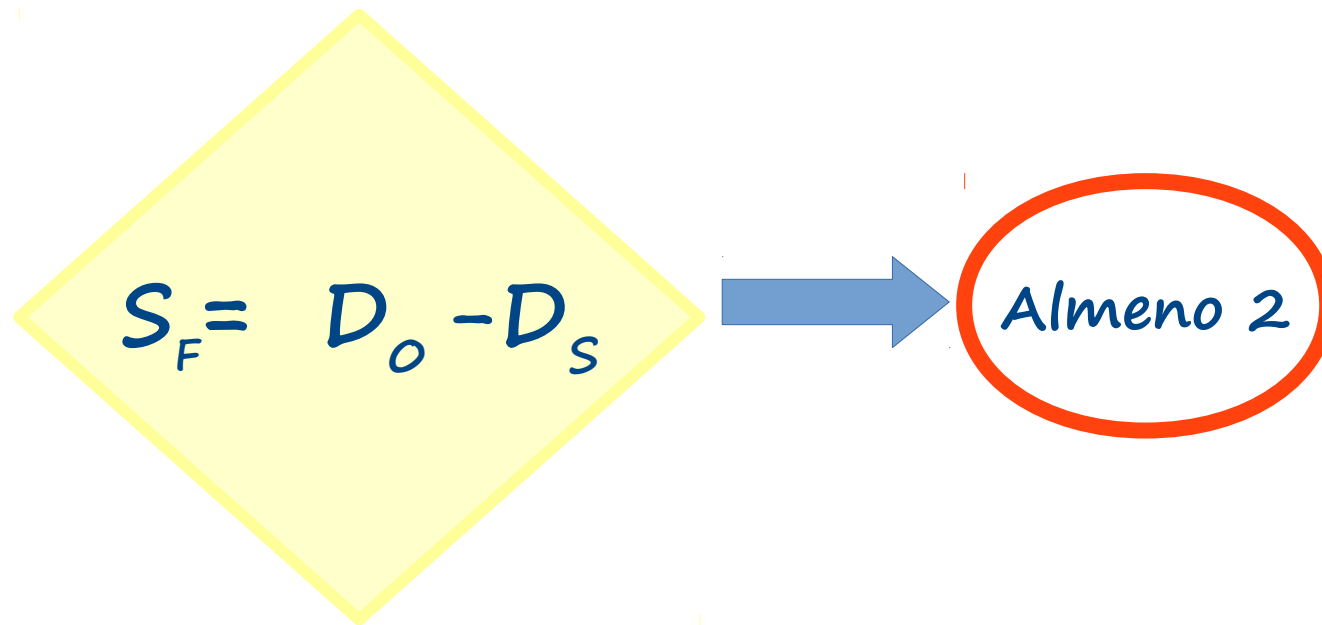
Nel caso dei tests quantitativi su terreni solidi la selettività è il risultato della differenza tra la crescita di microrganismo non target in :

- 1) TERRENO DI RIFERIMENTO NON SELETTIVO
- 2) TERRENO SELETTIVO del quale vogliamo valutare la performance (nel nostro esempio ALOA)





Per i terreni solidi valutati per le performance con test quantitativi è considerato un valore adeguato di selettività:





Nel caso dei tests qualitativi su terreni solidi o terreni liquidi la selettività NON viene calcolata come differenza tra due terreni a confronto ma in termini di inibizione totale o parziale del microrganismo non target seminato

Esempio calcolo qualitativo della **Selettività**

MRS (Man, Rogosa E Sharpe Agar) seminato con *E. coli* e *Bacillus cereus* per $72 \pm 43h$ a $30 \pm 1^\circ C$



MRS seminato con *L. casei*



MRS seminato con *E.coli*
e *B. cereus*

**TOTALE
INIBIZIONE**



SPECIFICITÀ

“Dimostrazione in condizioni definite, che microrganismi non target non mostrano le stesse caratteristiche dei microrganismi target”

E' eseguita solo per i test qualitativi su terreni solidi



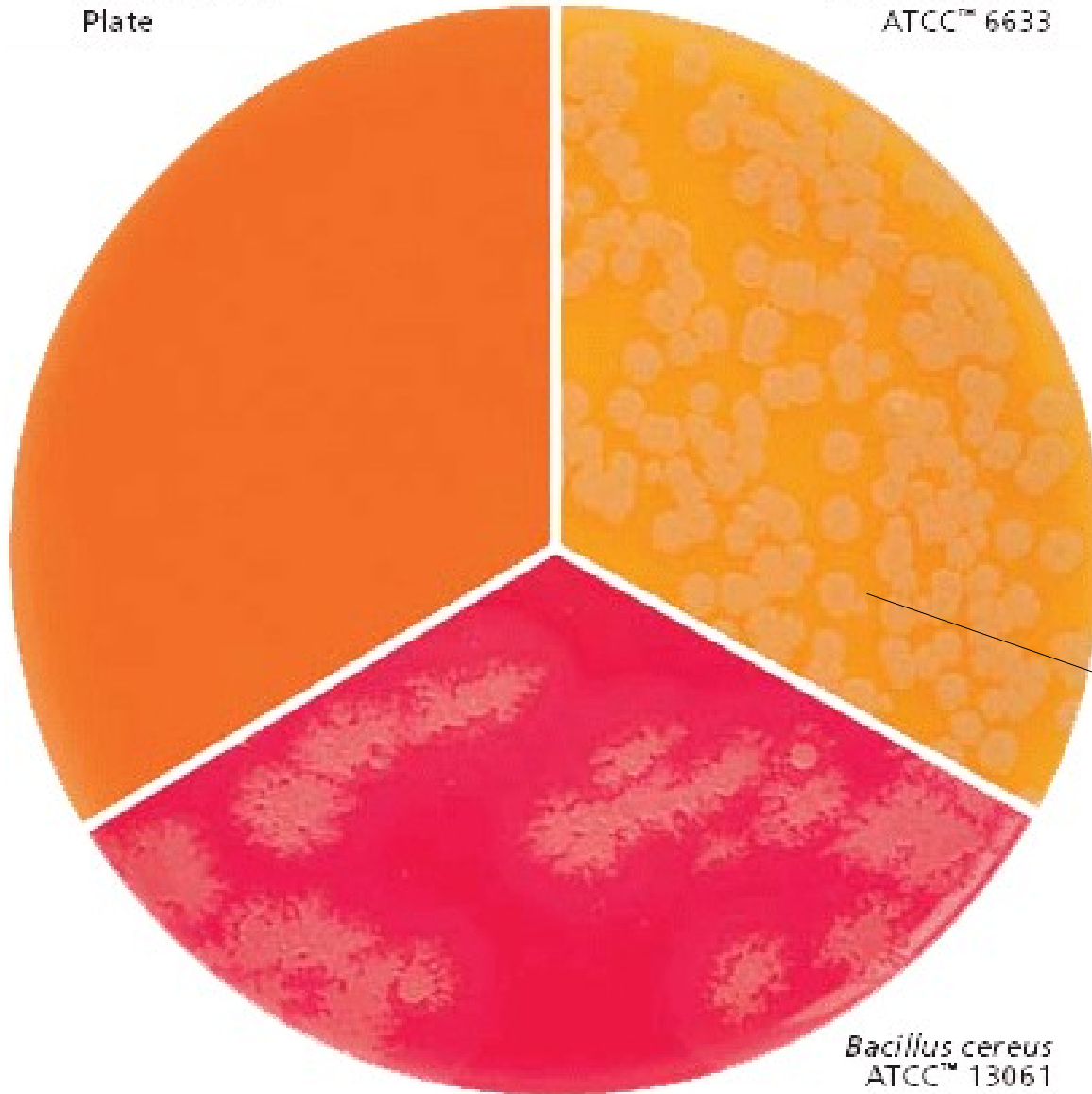
Uninoculated
Plate

Bacillus subtilis
ATCC™ 6633

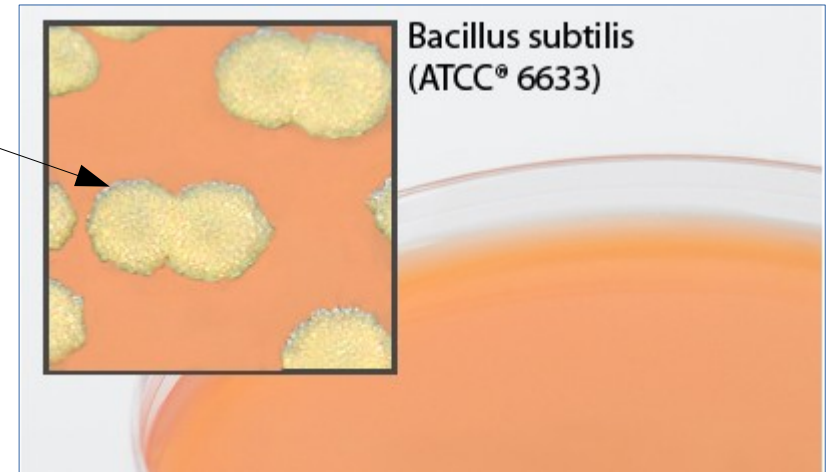
Esempio controllo della **SPECIFICITÀ**

MYP (Mannitol egg yolk polymyxin agar) seminato con *Bacillus subtilis* Sub. spizizenii

ATCC™ 6633 per 44 ± 4 h a $30 \pm 1^\circ\text{C}$



Bacillus cereus
ATCC™ 13061



Bacillus subtilis
(ATCC® 6633)

COLONIE GIALLE SENZA ALONE DI
PRECIPITAZIONE



CONSIDERAZIONI....





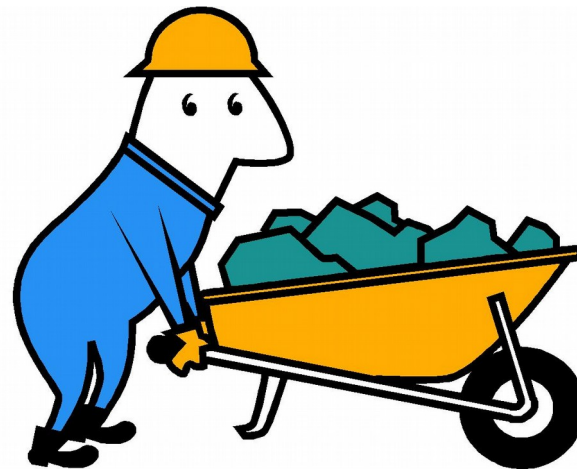
Sebbene la ISO 11133:2014 specifichi in dettaglio il metodo per il calcolo quantitativo della Selettività, di fatto non prevede terreni **nell'allegato** di riferimento, da valutare in questo modo. Questo vuol dire che **per applicare il calcolo della selettività con metodica quantitativa su terreno solido il produttore deve definire, per i terreni non contemplati nell'allegato quantomeno i Ceppi non target da utilizzare nella prova**





















ALLEGATO E: SPECIFICA COME
EFFETTUARE IL CALCOLO DELLA
SELETTIVITÀ, PRODUTTIVITÀ,
SPECIFICITÀ PER 52 TERRENI



Dopo una prima fase di “entrata a regime” nella quale le analisi verranno effettuate sui 52 terreni previsti nell’Allegato E, l’IZSLT dovrà sottoporre ad analisi tutti i lotti dei 228 terreni prodotti. Questo implicherà





- ☐  POS MIC 054 NOR-1 rev 0 modulo
- ☐  POS MIC 054 NOR-2 rev 0 modulo
- ☐  POS MIC 054 NOR-3 rev 0 modulo
- ☐  POS MIC 054 NOR-4 rev 0 modulo
- ☐  POS MIC 054 NOR-5 rev 0 modulo
- ☐  POS MIC 054 NOR-6 rev 0 modulo
- ☐  POS MIC 054 NOR-7 rev 0 modulo
- ☐  POS MIC 054 NOR-8 rev 0 modulo
- ☐  POS MIC 054 NOR-9 rev 0 modulo
- ☐  POS MIC 054 NOR-10 rev 0 modulo
- ☐  POS MIC 054 NOR-11 rev 0 modulo
- ☐  POS MIC 054 NOR-12 rev 0 modulo
- ☐  POS MIC 054 NOR-13 rev 0 modulo
- ☐  POS MIC 054 NOR-14 rev 0 modulo
- ☐  POS MIC 054 NOR-15 rev 0 modulo
- ☐  POS MIC 054 NOR-16 rev 0 modulo
- ☐  POS MIC 054 NOR-17 rev 0 modulo
- ☐  POS MIC 054 NOR rev 0

PER APPROFONDIRE: POS MIC 054 NOR REVO



GRAZIE PER L'ATTENZIONE!

