

Webinar

“NUOVA REVISIONE ISO 7218:2024:

Approfondimento per i laboratori di prova della norma cardine di microbiologia”

QUESTIONS & ANSWERS

Di seguito domande, con relative risposte, inviate in chat durante e alla fine del webinar

Q 1	<p>Nel paragrafo 11.2.7.2.1 viene però riportata l'indicazione "For a result to be valid it is generally considered necessary to retain AT LEAST TWO COUNTABLE PLATES (duplicates from the same dilution or plates from two successive dilution)" mentre prima era indicato che "considered necessary to count the colonies on at least one dish containing at least 10 colonies", quindi a primo impatto sembra che il vincolo sia aumentato anzichè diminuito. Potrebbe chiarire questo punto, per favore?</p>
A	<p>Come riportato nella revisione precedente della norma era necessario effettuare la conta su almeno due piastre, una per diluizione successiva (es. -1 e -2 non -1 e -3), con una piastra contenente almeno 10 colonie. Il “vincolo”, forse meglio chiamarla “regola”, a cui si fa riferimento, era dovuto al fatto che la formula della 2007-2013, per essere valida, non mi permetteva di inserire al numeratore un valore inferiore a 10, mentre nella 2024 si.</p> <p>Il “vincolo” lo avevo riferito quindi alla regola delle “almeno” 10 colonie applicate alla conta: non c’era infatti “libertà” di contarne meno perché la formula fosse valida.</p> <p>La formula generale di conta 2024 § 11.2.7.2.2. appare più “complessa” di quella del 2007/2013 § 10.3.2.2 e quindi maggiormente “vincolante” in termini di utilizzo e impostazioni di calcoli nel LIMS. A tutti gli effetti, come commentavo nella presentazione le due formule 2024 e 2007/2013 presentano uguale numeratore (sommatoria delle conte) se togliamo la regola delle 10 colonie della 2007/2013, e uguale denominatore se utilizziamo la 2024 con dati provenienti solo da due piastre, una per diluizione successiva: dato confermato dal fatto che, negli esempi numerici delle due formule da norma, quello del 2024 e quello 2007/2013, sono proposti gli stessi dati grezzi di conta, diluizione e volume inoculato, con l’ottenimento dello stesso risultato finale: 16 545 ufc/g o ml in entrambe le ISO 7218:2024 e ISO 2007 e Amd.1 2013.</p> <p>La formula 2007/2013, da come è costruito il denominatore accetta valori di conta solo da due piastre ciascuna appartenente ad una diluizione successiva (es, una alla -1 e una alla -2).</p> <p>A differenza della formula 2007/2023, da come è costruito il denominatore della 2024, quest’ultima è valida anche per la conta di due piastre della stessa diluizione (es. due alla -1), potendo operare così come descritto al § 11.2.1 se non si esegue una diluizione successiva.</p>

Q 2

Nella slide pagine 36-37 trasporto campioni si riferisce sempre a 2024? nella slide c'è scritto 2004. immagino sia un errore di battitura.

A

Ottimo occhio, si, è stato un errore di battitura.

Q 3

Se mediante apposite prove si dimostra che il congelamento del campione non va ad alterare la conta, non è possibile comunque congelare il campione in caso di necessità?

A

Buona domanda, purtroppo la norma è categorica e, in modo imperativo, dichiara che non è possibile congelare i campioni prima dell'analisi senza lasciare alternative come erano possibili nel 2007/2013.

Collegli francesi, relativamente a questo punto normativo, hanno commentato come potrebbe essere diverso organizzare le partenze delle analisi e, da operatore di Laboratorio, La comprendo benissimo, in tal senso.

In questo punto la norma inoltre non dice "se diversamente presente in un standard specifici" quindi non lascia la possibilità di poter fare prove.

Q 4

Nella slide relativa all'omogeneità della temperatura degli incubatori (Pagina 16), è stato specificato che non è necessario effettuare prove di omogeneità per frigoriferi/congelatori. Ho compreso correttamente?

A

Si, certo. A mio parere non avrebbe senso effettuare solo prove di omogeneità per gli incubatori e non per frigoriferi anche perché quest'ultimi sono spesso, per motivi strutturali (se non ventilati) molto meno uniformi dei termostati che sono per la maggior parte dotati di ventole interne. Si può ipotizzare che nei frigoriferi con un range di temperatura di 6 °C (3°C), molto più ampio degli incubatori, l'incidenza della scarsa uniformità (es. esagerando 4 gradi di differenza tra il punto con temperatura più elevata e quello più basso) si possa ritenere accettabile.

Al § 6.3.5 "Frigoriferi e celle frigorifere" non si trova nel documento 2024 nessun riferimento a questa attività di omogeneità che invece appare nel § "6.3.2" per gli incubatori e che viene quest'ultima confermata al § "6.3.2.4" sempre per gli incubatori dove è scritto di controllarla "alla temperatura di lavoro".

Nella RT-08 di ACCREDIA, revisione in vigore, al § 6.4.6 è scritto: "relativamente ad apparecchiature quali incubatori, stufe, camere climatiche deve essere tarato il datalogger/termometro all'interno e si rammenta che la prova di omogeneità è una valutazione preliminare". Anche qui non sono citati esplicitamente i frigoriferi.

Ci si può chiedere se, avendo in Laboratorio frigoritermostati (dalla norma inseriti nel § 6.3.2 incubatori) che "lavorano" per esempio a 37 °C durante la settimana e 5 °C nel weekend, devo effettuare la prova di omogeneità sia a 37 °C (esempio di utilizzo) che e a 5 ± 3 °C.

Interpretando la norma 2024 darei risposta negativa per prova di omogeneità a 5 °C sia per frigoriferi e per frigotermostati. Quest'ultimi non hanno la "temperatura di lavoro" a $5 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$ ma, come i frigoriferi, quella di conservazione delle piastre "dishes" (come dice la norma ISO 7218).

Si sottolinea il dato che la norma ISO 7218 al punto 11.2.5 permette la conservazione di piastre mentre le ISO standard specifiche, come la UNI EN ISO 6579-1:2020 anche quella di terreni liquidi, vedi al § 9.2 con l'acqua peptonata tamponata per 72 ore. Aspetto quindi da chiarire, anche se non sembra così critico.

Q 5

Che idea avete di struttura dei controlli interni di qualità esempi?

A	<p>Domanda stimolante. CIQ sono importanti almeno quanto quelli esterni e fanno capire in tempo reale, e non una volta all’anno o più come con quelli esterni, la validità dei nostri risultati potendo così agire immediatamente in caso di loro non conformità (testuali parole della norma). La frequenza e la tipologia dipendono naturalmente dalla operatività e dai volumi analitici del Laboratorio. Il consiglio è quello di effettuare un attento approccio basato sul rischio (<i>risk-based approach</i>) per frequenza e tipologia di metodi di prova per i CIQ da implementare.</p> <p>Risulta comunque importante eseguire controlli positivi per metodi qualitativi e quantitativi e controlli bianchi per verificare eventuali cross-contaminazioni non accettabili da ISO 7218. In Laboratorio effettuiamo anche la prova di “replicazione” (traduzione di “<i>replication</i>” dalla norma) giornaliera e la chiamiamo di “ripetibilità” per i nostri diluitori automatici in base 10. Verifichiamo che utilizzando il parametro “conta <i>E. coli</i>” (metodo con lettura a 24 ore delle piastre) siano rispettati i limiti di ripetibilità del metodo stesso al fine di dare la conformità al controllo. Allestiamo una coltura “<i>overnight</i>” di <i>E. coli</i> per poi essere utilizzata il giorno successivo nei diluitori automatici. Il metodo di conta <i>E. coli</i>, avendo i risultati di conta il giorno successivo all’analisi, ci permette di capire se i diluitori automatici (comunque tarati e verificati periodicamente) hanno effettuato conformemente le diluizioni effettuate il giorno precedente.</p> <p>Interessanti anche i “<i>spiked samples</i>” e i controlli negativi con microrganismi “non target” o “atipici”. Questi controlli, direi, da non eseguire con le stesse frequenze dei controlli positivi, bianchi e di “replicazione” e comunque da valutare sempre sulla base del volume numerico di campioni di routine presenti il Laboratorio con una attenta analisi basata sul “<i>risk-based approach</i>”.</p>
---	---

Q 6	<p>Per quanto concerne il paragrafo 17.4 relativo alla verifica dei metodi, i metodi normati che non contengono dati di validazione e relativi alle analisi da condurre sulle acque destinate al consumo umano, è necessario confrontarsi ugualmente con la ISO 16140-3?</p>
A	<p>Buona domanda, ISO 7218:2024 indica, indirettamente, di applicare la serie ISO 16140 di validazione/verifica solo ad acque inserite in alimenti o ritenute “alimento” (“<i>food</i>” nella norma) dalla legislazione nazionale.</p> <p>La norma europea “<i>The recast Drinking Water (DVD)</i>” prende in considerazione e classifica le acque e non gli alimenti (“<i>food</i>”). Al suo interno è menzionata l’acqua destinata al consumo umano. Quindi è necessario applicare per studi di validazione/verifica dell’acqua destinata al consumo umano la UNI EN ISO 13843:2017 “Qualità dell’acqua – Requisiti per la definizione delle caratteristiche prestazionali di metodi microbiologici di tipo quantitativo”</p>

Q 7

Se troviamo per esempio solo 2 colonie alla - 1 come si esprime il risultato, come 20 colonie stimate o come < 40? (microrganismi presenti ma inferiori di 40)

A

Buona domanda, dobbiamo esprimere il risultato come “microrganismi presenti ma < a 40 ufc/g”. Il foglio di calcolo ISO è in questo momento fuorviante facendo apparire la voce “*estimated count*” vicino alla conta 1,8E+01.

Initial suspension : 1/10	
Volume/Petri dish [mL] 1	

Dilution	Number of colonies		Colonies to confirm		Confirmed colonies	
	Plate A	Plate B	Plate A	Plate B	Plate A	Plate B
-1	2					
-2	0					

RESULTS		
Number of CFU/g or mL:	1.8E+01	Estimated count

Q 8

Per i metodi che prevedono più piastre, ad esempio 3 per 1 diluizione, è possibile usare i fogli di calcolo?

A

Tecnicamente si!

Ammettiamo di contare alla prima diluizione -1 su DRBC agar, su tre piastre con un volume complessivo seminato di 1 ml (0,3 ml per piastra), 6, 8, 9 colonie (totale 23 colonie) e 4, 0, 0 a quella successiva.

L'esempio di norma al § 11.2.7.2.7, anche se applicabile al solo “Calcolo su piastra, caso speciale: limite di determinazione più basso (con un set di piastre Petri)”, a cui segue quello del foglio di calcolo ISO indica che il risultato finale di conta della norma è identico a quello di calcolato dalla “ISO calculator” e quindi il foglio di calcolo è utilizzabile.

$$N = \frac{(6+8+9)+4}{1 \times [1+(0,1 \times 1)] \times 10^{-1}} = \frac{27}{0,11} = 245$$

Rounding off the results, the number of microorganisms is $N = 250$ or $N = 2,5 \times 10^2$ cfu/g or ml.

where

ΣC is $(6 + 8 + 9) + 4 = 27$;

V_{set} is 1 ml of dilution plated in total in the first set of plates;

n_1 is 1 Petri dish (the three Petri dishes are considered as only one);

n_2 is 1 Petri dish retained for the subsequent dilution;

d is $0,1 = 10^{-1}$ dilution corresponding to the more concentrated dilution retained.

Initial suspension : 1/	10
Volume/Petri dish [mL]	1

Dilution	Number of colonies		Colonies to confirm		Confirmed colonies	
	Plate A	Plate B	Plate A	Plate B	Plate A	Plate B
-1	23					
-2	4					

RESULTS

Number of CFU/g or mL: **2.5E+02**

Is the difference in counts between plates used in parallel at the first dilution acceptable?

Se si contasse sulle prime tre piastre alla prima diluzione leggibile (tal quale per i liquidi e – 1 per i solidi) una quantità di colonie inferiore a 10 (es. 9 con piastre con 3,3,3 colonie) e nessuna colonia contata alla diluzione successiva (0,0,0 colonie), immettendo il valore di 9 nella formula alla -1 e 0 alla -2, il calcolatore da giustamente “*estimated count*” (vedi sotto con prima diluizione utile -1). Si veda esempio di calcolo sul foglio elettronico alla domanda 10.

Q 9 I calcolatori scaricabili sono già validati?

Buona intuizione, sicuramente sì, anche se non scritto esplicitamente sia nella norma 2024 che all'interno nei fogli di calcolo stessi. Sappiamo la loro versione e l'anno di emissione (veda sotto), in caso di modifiche da parte di ISO. A mio parere, i fogli devono essere verificati per i calcoli presenti suggerendo, a tale scopo, di utilizzare i dati grezzi di esempi di conta nella ISO 7218:2024. Dagli esempi fatti nel corso, i calcoli funzionano perfettamente sia con dati grezzi del 2024 che del 2007/2013 a parità di formula. Secondo il mio parere è possibile richiedere da UNI una dichiarazione di validazione dei fogli di calcolo da parte di ISO.

A

Control versions

Version 1.6 (27 aug 2020):

Results on scientific notation for swabs (cell E16)

Correction results when a space is included between > and the cfu (cell Q15)

Q
10

E' possibile considerare un risultato valido se nella prima diluizione conto solo 9 colonie e nella seconda diluizione non ho colonie? Ed in questo caso devo considerare la seconda diluizione nel calcolo?

A

Domanda interessante. Sì, certo e nel caso specifico si ricade sotto la "conta stimata", vedi esempio da foglio di calcolo.

Initial suspension : 1/10
Volume/Petri dish [mL] 1

Dilution	Number of colonies		Colonies to confirm		Confirmed colonies		Final number of colonies	
	Plate A	Plate B	Plate A	Plate B	Plate A	Plate B	Plate A	Plate B
-1	9							
-2	0							

RESULTS

Number of CFU/g or mL: **8.2E+01** Estimated count

Q 11

Secondo la nuova versione della norma è quindi necessario / obbligatorio che la preparazione della diluizione primaria avvenga sotto cappa a flusso laminare per garantire la "sterilità" dell'operazione?

A

Domanda stimolante. Al punto 10.1.2 della norma vengono descritte le precauzioni di base durante la manipolazione dei campioni prima dell'esecuzione delle analisi in questo modo:

· Use a biological safety cabinet for handling samples likely to contain pathogenic bacteria.

Innanzitutto è necessario identificare quali sono i batteri patogeni. *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* sono *Biohazard Level 2* (BLS 2), livello di rischio biologico, come tanti altri potenzialmente presenti in Laboratorio (*E. coli*, *B. cereus* ecc.). Da chiedersi se la classificazione di BLS permette di determinare batteri patogeni e non patogeni a parità di livello 2 oppure esiste un'altra classificazione o modalità di valutazione che non credo esista.

Una volta chiarito il primo concetto, solo con una attenta analisi dei rischi microbiologici presenti nei punti critici di controllo di Laboratorio, come suggerisce la norma 2024 in materia di sicurezza dell'operatore, saremo in grado di determinare se c'è possibilità che vi siano batteri patogeni nei campioni (sulla base della loro tipologia di matrice suppongo), in determinate aree del Laboratorio, durante l'attuazione di specifiche attività.

Il termine "*handling samples*", manipolazione dei campioni, nella frase in inglese di cui sopra e citata nel § 10.1 "Precauzioni igieniche durante la preparazione dei campioni e loro analisi" ci fa capire che l'utilizzo della cappa inizia dalla sospensione iniziale (diluizione primaria) degli stessi per poi continuare con i metodi di prova.

Troppi aspetti sono quindi non chiari in questa frase inglese sopra riportata e, prima di prendere provvedimenti scriverei a UNI per aver chiarimenti critici e pratici in merito, visto il suo impatto importante relativamente alla operatività e ai costi del Laboratorio.

In conclusione, sulla base di quanto si apprende dalla norma, la mia risposta è di utilizzare la cappa con livello di biosicurezza classe 2 (Class II *biosafety cabinet*) solo se, durante la manipolazione del campione, dalla diluizione iniziale alle fasi successive del metodo, si sospetta la presenza nel campione di batteri patogeni. che, con l'ufficiale classificazione del BSL a livello 2, non sono solamente *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* per esempio.

Q 12

E' necessario che i datalogger siano tarati da centro LAT (con RdT ISO 17025) o basta una taratura interna per confronto con un termometro primario già tarato in centro LAT ISO17025? In caso non sia necessatio, va bene anche che un centro LAT o centro assistenza faccia la taratura emettendo un RdT non accreditato?

A

Ottima domanda. Per i datalogger come per tutti i misuratori di temperatura è necessario fornire un certificato di taratura (CdT) di centro LAT o RdT interno eseguito con procedura interna di taratura utilizzando un termometro primario tarato da un centro LAT. Per la taratura interna il consiglio è, se non lo si sta già facendo, per determinare l'incertezza di taratura di effettuare almeno 10 misurazioni a distanza di un minuto una dall'altra una volta che la temperatura di taratura si è stabilizzata. I contributi dell'incertezza di taratura devono essere di tipo A (scarto tipo delle misure) e di tipo B (che prende in considerazione la risoluzione del primario, quella del datalogger e l'incertezza di taratura del primario da CdT e opzionali secondo il mio parere, i valori di omogeneità e stabilità del bagno termostatico utilizzato).

Q 13

Nel caso di metodi in PCR per ricerca salmonella validati AFNOR, la parte di conferma va fatta applicando in toto ad es la ISO 6579 (arricchimenti, piastra, conferme biochimiche e sierologiche) o è possibile fermarsi alla prima piastrazione?

A

Domanda interessante. Sono stati controllati alcuni metodi validati ISO 16130-2 da parte di "AFNOR Validation" relativi alla ricerca in PCR di *Salmonella* spp. Le prove di conferma del campione positivo in PCR variano tra metodi di prova *Salmonella* spp. validati AFNOR e, al loro interno, vengono descritte più metodiche di conferma.

Si può notare che tutti i metodi (quelli campionati), richiedono la conferma del positivo PCR partendo dal campione iniziale incubato e talvolta volta anche da fasi successive del metodo.

Interessante, nella fase di scelta del metodo validato AFNOR PCR per la ricerca della *Salmonella* spp., non solo la valutazione del metodo stesso ma anche quella delle sue modalità di conferma del campione positivo scegliendo così il metodo validato AFNOR più compatibile alle le esigenze e alle possibilità tecniche del Laboratorio.

ULTERIORI OSSERVAZIONI:

- Si precisa che la norma UNI EN ISO 7218:2024 è stata emessa il 25 luglio 2024.
- Come già nel 2007, in ISO 7218:2024 si ribadisce che “Le prove di qualifica del personale possono essere eseguite per metodo o tecnica” (la norma non presenta una definizione al capitolo 3 di “tecnica”, ma nel testo sono nominate più tecniche). Come è noto, vi sono diverse tecniche di microbiologia classica, biomolecolare, immunoenzimatica ecc. e per una tecnica, più metodi/metodologie. Quindi qualificando il personale per tecniche, comporterebbe, interpretando la norma, di effettuare una unica prova di qualifica per tutti i metodi microbiologici quantitativi con tecnica di spatolamento, compresi quelli con metodologia “*spiral*”, e una per tutti i metodi quantitativi con tecnica per inclusione. Come operare con le qualifiche per i metodi microbiologici qualitativi implementati il Laboratorio, per quelli qualitativi di PCR, per quelli quantitativi in MPN, per quelli con tecnica immunoenzimatica e per quelli quantitativi con tecnica per filtrazione su membrana (solo se l’acqua analizzata è inserite in alimenti o ritenute “alimento” (“*food*” nella norma) dalla legislazione nazionale ecc.? Si suppone che la qualifica deve essere effettuata per metodo di prova. Inoltre, dalla norma sono scaricabili fogli di calcolo “con tecniche di conta delle colonie” e, nella norma, sono indicate diverse tecniche di caratterizzazione microbiologica come la sierologica, e la biochimica come ad esempio nel caso di *Salmonella* spp. A mio parere è necessaria una richiesta di chiarimento a UNI sulla definizione di “*technique*”, come riportata al § 5.2 della norma magari riportando tale informazione nel capitolo 3 “Termini e definizioni”.
- La norma ISO 7218:2024 dichiara al § 6.3.7.2 che “l’incertezza dello strumento di misurazione della temperatura, che include tra gli altri fattori la risoluzione dello strumento e l’incertezza di taratura, dovrebbe essere quattro volte più piccolo dell’intervallo (“*range*”) della massima tolleranza permessa richiesta. Per esempio per una tolleranza di ± 1 questo non dovrebbe superare $0,5$ °C mentre per una tolleranza di $\pm 0,5$ °C non superare $0,25$ °C”.

La norma applica nell’esempio al § 6.3.7.2 “almeno quattro volte inferiore” non al valore assoluto dell’intervallo di massima tolleranza permessa richiesta (massimo errore permesso nella 2007) di 1 °C ma alla tolleranza, intesa come estensione/ampiezza del campo di operativo di temperatura (es. a $36,0-38,0$, 2 °C) dello strumento di rilevazione.

Nella norma del 2007 al § 5.28.2, dichiara che “l’incertezza di taratura accettabile dovrebbe essere almeno quattro volte inferiore all’errore massimo permesso di temperatura. Per esempio, per un errore massimo permesso ± 1 °C, l’incertezza di taratura dovrebbe essere $\pm 0,25$ °C e, nel caso di $\pm 0,5$ °C, $\pm 0,125$ °C”.

In conclusione, applicherei in Laboratorio quanto dichiarato nella ISO 7218:2024 al § 6.3.7.3 sulla base dei due esempi (intervallo di tolleranza massimo consentito ± 1 °C, incertezza di taratura accettabile $0,5$ °C e con intervallo di tolleranza massimo consentito $\pm 0,5$ °C, $0,25$ °C; aggiungo un esempio personale per i frigoriferi operanti a 5 ± 3 °C, l’incertezza di taratura dovrebbe essere non superiore a $1,5$ °C (± 3 °C = 6 °C di estensione/ampiezza del campo operativo della apparecchiatura di rilevazione della temperatura).

Non trovo chiarezza di quanto riportato nella norma 2024 al § 6.3.7.2 anche se il valore di accettabilità di incertezza, come da esempio di norma, $0,5$ °C, potrebbe

essere tecnicamente lo stesso di quello già applicato per i nostri strumenti di rilevazione di temperatura, l'attuale $\pm 0,25$ °C dell'esempio 2007 al § 5.28.2.

Quanto esprimiamo un valore di incertezza di taratura dei nostri strumenti di temperatura non è mai \pm "valore" come per l'incertezza di microbiologia. Mi sembra quindi più chiaro che il limite massimo di accettabilità della stessa, come presente da esempi di norma, sia descritto a ± 1 °C, come 0,5 °C (2024) invece che $\pm 0,25$ °C (2007).

Mi sembra doveroso chiedere a UNI la motivazione differente di tipologia di approccio metrologico rappresentato dai § 6.3.7.3 del 2024 e § 5.28.2, a fronte magari delle stesse modalità pratiche applicative (stesso valore di incertezza di taratura da utilizzare per le nostre apparecchiature di rilevazione della temperatura).

Per info: laboratori@aicq.it