

In ambito produttivo e analitico, è necessario **garantire adeguati livelli di igiene e comprovare la pulizia di superfici e strumenti di lavoro.**

Il reparto di controllo qualità e i laboratori di supporto hanno il compito di effettuare un monitoraggio costante, utile a reagire tempestivamente in presenza di contaminazioni e cross-contaminazioni che possono essere dannose per la qualità e la sicurezza.

Presenza di microrganismi e biofilm

Molti microrganismi hanno la capacità di aderire alle superfici, siano esse di acciaio, inox, ghisa, vetro, formica ecc, moltiplicandosi rapidamente grazie al depositarsi di materiale organico e alla formazione di una **matrice adesiva e protettiva** che essi producono per proteggersi, portando alla formazione del cosiddetto biofilm.

La capacità di aderire saldamente alle superfici e di creare colonie fermamente vincolate è posseduta, oltre che da germi alteranti, quali *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus spp*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus faecium* ecc., anche dai germi patogeni, quali *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolytica*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli O157*, ecc.

Per questo, la formazione di biofilm è un pericolo non solo per la vita conservativa dei prodotti, ma anche per la sicurezza.

La natura delle superfici influenza notevolmente le cariche microbiche, per cui i materiali che costituiscono le superfici di lavoro e anche tutte le superfici che non vengono a contatto diretto (pareti, pavimenti, soffitti) devono essere fatte di materiali impermeabili, facilmente lavabili e lisci.

Sanificazione ambientale

La superficie deve essere pulita adottando una buona strategia di sanificazione ambientale che, a seconda delle necessità, può prevedere tutti o una parte di questi passaggi:

- Prelavaggio, rimozione per azione meccanica (getti di acqua, spugne abrasive, spazzole).
- Detersione, rimozione con detergente e acqua calda (50-60°C) dello sporco persistente.
- Risciacquo intermedio, allontanamento con acqua fredda del detergente e dello sporco.
- Disinfezione, distruzione dei microrganismi patogeni e riduzione della carica microbica, ad esempio con l'utilizzo di salviette impregnate di alcool.
- Risciacquo finale per l'allontanamento dei residui di disinfettanti.

Infine, si procede alla **verifica del livello di igiene** raggiunto, con l'ausilio di metodiche e devices opportunamente scelti.

I controlli si possono collocare a vari livelli:

- **valutazione di parametri indicatori di igiene come la presenza di ATP**
- **ricerca di microrganismi indicatori o patogeni**
- **ricerca di allergeni ecc..**

Verifica del livello di igiene - Sostanze organiche

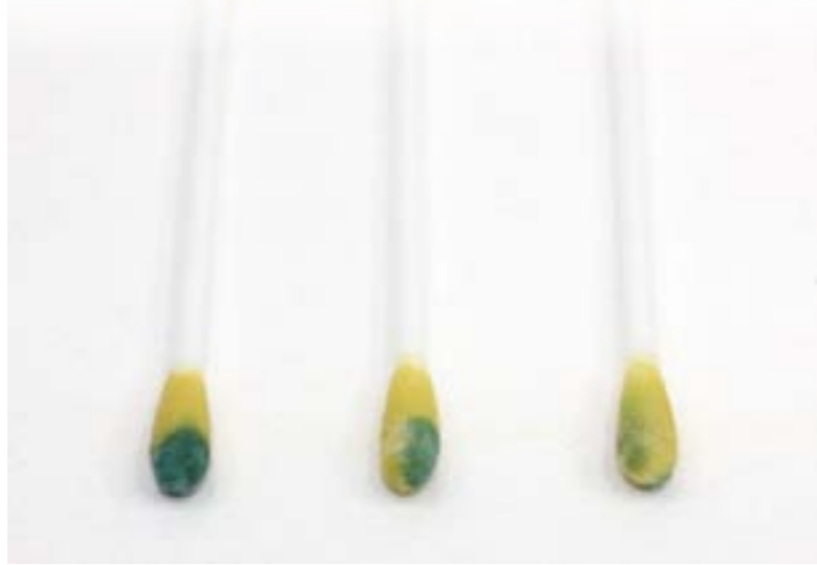
Per la verifica del livello di igiene, con il confronto immediato del prima e dopo la procedura di pulizia, si possono usare dei **kit per la rilevazione delle sostanze organiche** che costituiscono lo sporco, tra cui proteine, polisaccaridi, grassi, ATP; tutte sostanze correlate alla presenza di microrganismi, che potrebbero essere patogeni.

Questi kit sono solitamente costituiti da **tamponcini impregnati di un indicatore colorimetrico** che cambia colore in presenza della sostanza organica ricercata oppure di tamponcini la cui reazione va letta con un **bioluminometro** (nel caso dell'ATP).

Tamponcini indicatori di proteine - [clicca link interattivo](#)

Permettono di verificare in modo semplice e immediato la presenza di residui proteici. I tamponcini sono dotati di un indicatore che cambia colore in presenza di proteine, quindi di sporco.

Non è richiesta alcuna attrezzatura di laboratorio e il risultato può essere valutato subito, visivamente.



Bioluminometro - [clicca link interattivo](#)

Strumentino portatile in grado di rilevare in tempo reale la contaminazione da ATP+AMP+ADP e quindi il grado di pulizia delle superfici. Kairosafe propone il Lumitester Smart abbinato ai tamponcini Lucipac. Il risultato è rapido, quantitativo e preciso e lo strumento è utilizzabile in tutti gli ambiti.



Verifica del livello di igiene - Microrganismi

Il prelievo ambientale per l'analisi microbiologica classica

Il campionamento ambientale si esegue secondo la metodica ISO 18593:2018 e ha lo scopo di prelevare un campione rappresentativo della superficie in esame, da sottoporre a successiva analisi microbiologica.

Per il campionamento è possibile utilizzare tamponi, spugnette, panni sterili o i boot-swabs:

Tamponi - [clicca link interattivo](#)

Adatti a superfici piccole ($\leq 100 \text{ cm}^2$) lisce o punti difficilmente raggiungibili, anche per contaminazioni elevate.

I tamponi sterili sono inumiditi con soluzione neutralizzante e poi strisciati su una superficie delimitata di 10x10 cm, con movimento incrociato.

Vengono poi riposti in una provetta contenente fisiologica o terreno di trasporto, seminati sui terreni desiderati e incubati. Ciò permette di stabilire il numero di UFC presenti e quindi il numero di microrganismi per centimetro quadrato. I tamponi si presentano essere asciutti o pre-umidificati.

La testa può essere di cotone, viscosa, poliestere...mentre lo stelo di legno, polipropilene o polistirene.



Spugnette - [clicca link interattivo](#)

Utili per superfici ampie ($> 100 \text{ cm}^2$) lisce, anche non piane, punti difficilmente raggiungibili, carcasse, anche per contaminazioni elevate.

La spugna viene umettata con soluzione sterile e strisciata uniformemente sulla superficie (10x10 cm). Dopo il prelievo, la spugna va riposta in un sacchetto sterile con l'aggiunta di terreno di trasporto o diluente, da cui, dopo un passaggio in Stomacher, verrà prelevata un'aliquota da seminare sul terreno di coltura.

Nel caso di analisi di tipo qualitativo (Salmonella e Listeria) si arricchisce la spugna con un adeguato pre-arricchimento in modo da recuperare le cellule che possono aver subito danni subletali.

Panni - [clicca link interattivo](#)

Utili per superfici ampie ($> 100 \text{ cm}^2$) lisce, anche non piane, punti difficilmente raggiungibili, carcasse, anche per contaminazioni elevate. Il panno viene inumidito con soluzione sterile e strisciato sulla superficie (10x10 cm). Dopo il prelievo, si pone il panno nel sacchetto sterile per il successivo trattamento.

Boot swabs - [clicca link interattivo](#)

Si tratta di speciali sovrascarpe utilizzati per il campionamento di Salmonella negli allevamenti. I sovrascarpe sono preumidificati e accompagnati da guanti e bustine per il trasporto.

Kit per analisi microbiologica diretta sulle superfici

E' possibile utilizzare anche altri sistemi per determinare la carica microbica sulle superfici, ad esempio le piastre da contatto e slides i kit rapidi:

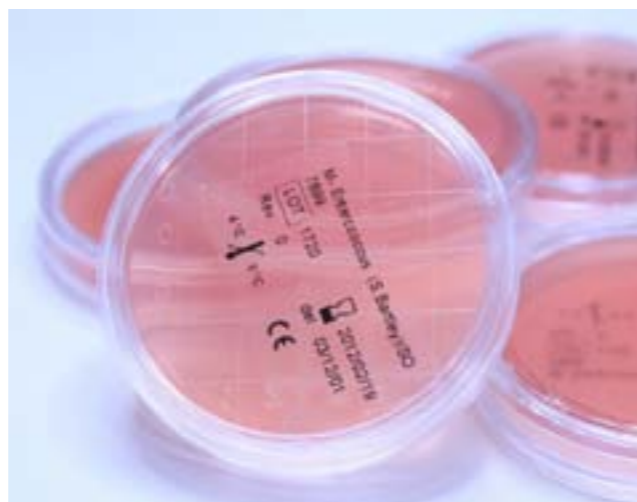
Piastre da contatto e slides - [clicca link interattivo](#)

Le piastre con diametro di 55 mm (superficie 24 cm²) e fondo reticolato sono riempite con agar a formare una superficie convessa, che va appoggiata alla superficie per circa 10 secondi.

L'utilizzo di queste piastre è molto diffuso per la semplicità di utilizzo e la ripetibilità dei risultati. Possono essere utilizzate su una gran varietà di superfici, purché lisce e di facile accesso.

Nella scelta del tipo di terreno, va considerata l'eventuale esigenza di neutralizzare l'effetto battericida o batteriostatico dei disinfettanti utilizzati per la pulizia delle superfici, per questo ai normali terreni possono essere aggiunti agenti neutralizzanti quali lecitina, tween 80, istidina, sodio tiosolfato ecc.

Alternativamente, si possono usare le cosiddette slides, palette di plastica con una striscia di agar su entrambi i lati. Le piastre e le slides si pongono in incubatore senza ulteriori passaggi alla temperatura e per il tempo necessario.



Kit micro rapidi - [clicca link interattivo](#)

Normalmente, con le tecniche tradizionali non si possono ottenere risposte circa il grado di inquinamento di un prodotto prima di 3 giorni per la carica batterica e prima di 5-7 giorni per un controllo rapido di sterilità.

A disposizione dell'utilizzatore vi sono vari kit rapidi per la ricerca di microrganismi, basati sulla bioluminescenza, la colorimetria, la fluorescenza, l'amplificazione di acidi nucleici ecc.

I test colorimetrici sono costituiti da brodi di coltura che cambiano colore in presenza di determinate condizioni, che sono correlate con la crescita batterica. Si tratta di test che permettono di rilevare la crescita batterica in tempi molto più brevi rispetto ai metodi classici, ma proprio perché rilevano la crescita, non sono immediati.



Risultati del campionamento e limiti

Il risultato del monitoraggio microbiologico delle superfici si esprime in Unità Formanti Colonie (UFC)/unità di superficie. Se, utilizzando i tamponi e le spugnette, si fa riferimento ad un quadrato di campionamento 10x10 cm, il risultato è espresso in UFC/100 cm²; se invece non è possibile utilizzare un delimitatore perché la superficie non è abbastanza liscia e ampia, si fa riferimento all'unità di campionamento (tampone/spugna). Con le piastre da contatto si considera la superficie della piastra e quindi il risultato è espresso in UFC/24 cm².

Il giudizio sulla qualità microbiologica deve essere espresso in base agli standard stabiliti internamente, e può essere completata tenendo conto di due limiti:

- Limite di Allerta: il numero di UFC è tale da indicare una deviazione rispetto alle condizioni operative standard. Il suo superamento deve "mettere sull'avviso" ed indurre ad una valutazione attenta dei processi effettuati e del comportamento del personale.
- Limite di Azione: segnala una situazione critica da correggere immediatamente.

Tali limiti non possono assumere il significato di un valore assoluto, ma vanno inquadrati all'interno di un trend e valutati seguendo le caratteristiche dell'ambiente a cui sono riferiti.

Nuove tendenze

Verifica del livello di igiene - Allergeni alimentari

Sempre più diffusa è la necessità di rilevare la presenza di allergeni alimentari e diverse specie di carne sulle superfici di lavoro, utensili e macchinari.

Test rapidi allergeni - [clicca link interattivo](#)

Si tratta di test immunoenzimatici di screening per glutine, latte, uovo, pesce, frutti di mare, soia, mandorla, arachide, sesamo, grano saraceno, mango.

Test ELISA allergeni - [clicca link interattivo](#)

Per analisi quantitativa di glutine, latte, uovo, pesce, frutti di mare, soia, mandorla, arachide, sesamo, anacardo, nocciola, lupino, senape, pistacchio, noce, noce pecan.

Verifica del livello di igiene - Specie di carne

Test rapidi specie carne - [clicca link interattivo](#)

Si tratta di test immunocromatografico di screening per carne di mucca, maiale, pecora e pollame.

Test ELISA specie carne - [clicca link interattivo](#)

Per analisi quantitativa di carne di mucca, maiale, pecora, pollame e cavallo

Conclusioni

L'approntamento di un adeguato piano di monitoraggio delle superfici consente di mantenere sotto costante controllo le aree operative. In parallelo si associano la verifica dei parametri ambientali di temperatura e umidità, la verifica della contaminazione particellare dell'aria e il controllo degli operatori. La scelta dei metodi di campionamento più idonei, un'adeguata frequenza dei test ed una pronta risposta alle eventuali deviazioni riscontrate rappresentano i punti di forza di un controllo qualità efficiente e risolutivo.



INDICATORI DI IGIENE DELLE SUPERFICI

Pro-Check (codice CC-4008): Il viraggio da giallo a verde chiaro indica la presenza di più di 20 µg di proteine. Il viraggio al verde scuro indica la presenza di più di 150 µg.

Hygiene Monitoring System (codice KPRO2-E69): Kit per la rilevazione di residui proteici su superfici. Viraggio da ambra a blu, limite 1 µg.

PRO1 + PRO1 Reader: Sistema con tamponcino per la rilevazione di residui proteici su superfici + strumentino per lettura.



BIOLUMINOMETRO

61324: Lumitester Smart strumentino portatile con tamponcini abbinati per rilevazione contaminazione ATP+ADP+AMP su superfici oppure liquidi.

1702671-60361: Tamponcini Lucipac A3 Surface

1702672-60365: Tamponcini Lucipac A3 Water



TAMPONCINI

Ampia gamma di tamponi asciutti, umidi, corti, lunghi, cotone, viscosa... Ecco solo alcuni esempi:

Corti

MW784-5 Tamponcino in 5 ml buffer neutralizzante ISO 18593

MW785-5 Tamponcino in 10 ml buffer neutralizzante ISO 18593

MW799-5 Tamponcino asciutto in provetta con tappo a vite

Lunghi

TS9-D Tamponi asciutti. Tampone cotone in peel pouch

TS16-A Tamponi asciutti. Tampone cotone in provetta

TS5-40 Tampone viscosa / Stelo spezzabile blu polistirene + 5 ml buffer neutralizzante ISO 18593



SPUGNETTE

Gamma per ambiente, esempi:

SK003.0050 Spugna cellulosa 6x8 cm asciutta. Conf. sing. busta con tasca + guanto

SK011.0050 Spugna cellulosa 6x8 cm, preumidificata con 10 ml Neutralizing Peptone Buffer ISO 18593. Conf. singola busta con tasca + guanto

Con delimitatore incluso:

SK027.1050 Spugna cellulosa 6x8 cm asciutta. Conf. singola busta dual + template 10x10 cm + 2 guanti

Gamma per carcasse, esempi:

SK004.0050 Spugna cellulosa 6x8 cm, preumidificata con 10 ml Buffered Peptone Water. Conf. singola busta con tasca + guanto

Con delimitatore incluso:

SK033.1050 Spugna cellulosa 6x8 cm, preumidificata con 10 ml NaCl-Peptone solution, buffered. Conf. singola busta dual + template 10x10 cm + 2 guanti



PIASTRE DA CONTATTO E SLIDES

L'elenco degli agar in piastra da contatto è lunga, qui di seguito si trovano alcuni esempi:

4025A TSA + Lecitina + Tween 80. piastre contact

4018 SDA EP + Lecitina + Tween 80. piastre contact

4047A PCA APHA + ISO 4883:2003 + Lecitina + Tween 80 piastre contact

20244 TSA (Trypticasein Soy Agar) EP + ISO. piastre contact 90 mm

4425 TSA (Trypticasein Soy Agar) EP + ISO. piastre contact irradiate

4016 Pseudomonas Cetrimide Agar EP + ISO 22717 + D.M. 13.1.93. piastre contact

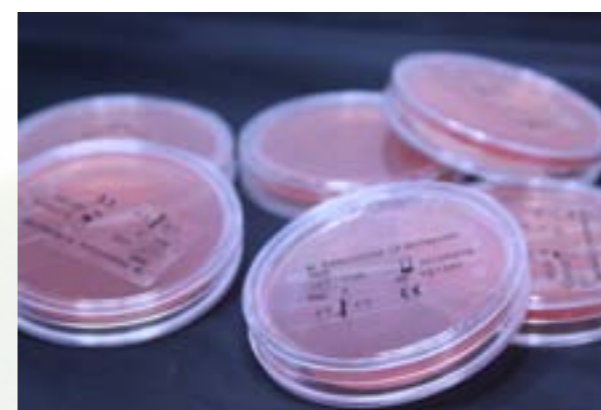
4011 Mac Conkey Agar EP + ISO 21150 + DM 13.1.93. piastre contact

4019 Mannitol Salt Agar (Chapman Medium) EP USP. piastre contact

7-476 PCA + TTC / Rose Bengal Agar (Neutr). Slides a 2 terreni su paletta rigida

7-404 PCA + TTC + Neutr / Rose Bengal Agar (Neutr). Slides a 2 terreni su paletta rigida

7-409 Cetrimide Agar / Mac Conkey Agar N°3. Slides a 2 terreni su paletta rigida



KIT RAPIDI PER LA RICERCA DI MICRORGANISMI SULLE SUPERFICI

PATH-CHEK (Codici PC010, PC020, PC080)

Per la ricerca selettiva di Listeria, Salmonella o Coliformi.

I microrganismi vengono recuperati dalla superficie di lavoro con l'ausilio di un tampone preumidificato con una soluzione neutralizzante, che viene poi trasferito in uno specifico brodo di coltura. Con l'incubazione, l'eventuale crescita del microrganismo ricercato determina il cambiamento del colore del brodo di coltura.

SWABSURE LISTERIA P (Codice SS-L01)

Anche in questo caso il campione è prelevato con un tamponcino che viene trasferito in uno specifico brodo di coltura. Il viraggio di colore consente di differenziare i ceppi patogeni di Listeria monocytogenes e Listeria ivanovii da altri ceppi non pericolosi, come Listeria innocua. Risultati in 24-48 ore.

MBS-HCCP&Acque Easy Test (Codici CBT-L01 ecc)

Test per carica batterica totale, coliformi, enterobatteri, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Pseudomonas, Listeria, Salmonella, Staphylococcus aureus.



KIT RAPIDI PER LA RICERCA DI ALLERGENI SULLE SUPERFICI

AGITEST GLUTINE

Test di screening per verificare la presenza di glutine (più di 20 PPM).
Si applica ad alimenti e bevande o campioni prelevati da superfici.

Vantaggi:

- risultati di tipo visivo
- 3 passaggi (preparazione del campione, estrazione, test)
- esito entro 15 minuti

Varianti per la ricerca di altri allergeni:

Soia - grano saraceno - caseina (latte) - mandorla - arachide - uovo - frutti di mare – pesce



GLUTEN R5 FLOW THROUGH

Test qualitativo per la rilevazione on-site di glutine in materie prime, semilavorati, prodotti finiti o campioni prelevati da superfici. Semplice, richiede attrezzature minime.

Permette di confermare che il livello di glutine sia conforme al Codex Standard 118:1979 (2015) e norme es. EU 609/2013 e 1169/2011.



Vantaggi:

- risultati di tipo visivo
 - 5 semplici passaggi
- durata del test 10 minuti (+ max 40 per l'estrazione)
- Flow Through, varianti per la ricerca di altri allergeni:
GLUTINE (non R5) - CASEINA (latte) – PESCE

GRAZIE PER L'ATTENZIONE!

BIBLIOGRAFIA

Controllo microbiologico: criteri e metodi analitici. Anna Maria Ferrini. Lab- Alimenti ISS

Campionamento per le varie tipologia di matrici alimentari. Mariella Talini. U.F. Biotossicologia Laboratorio di Sanità Pubblica AVC

Monitoraggio di parametri di processo ed ambientali. Francesca Balocco. Università di Genova

La gestione degli allergeni sotto il profilo tecnologico. Valeria di Siero. Ordine tecnologi alimentari regioni Piemonte e Valle d'Aosta

Contaminazione microbiologica e metodi rapidi. 52° Simposio AFI 2012

Metodo orizzontale per il campionamento da superfici mediante tamponi e spugne (ISO 18593:2018). IZSUM.