




Seminario “Laboratorio Nazionale di Riferimento *Listeria monocytogenes*”

Teramo , 10 Dicembre 2012



ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

**EU RL Lm - Linee guida in materia di
campionamento nelle aree di trasformazione
alimentare e attrezzature per la ricerca di
*Listeria monocytogenes***

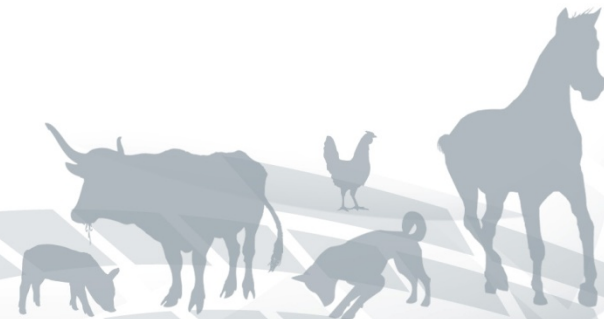


Cristina Marfoggia

Igiene delle tecnologie alimentari e dell'alimentazione animale
Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise “G. Caporale”



- ✓ Introduzione
- ✓ Scopo del campionamento ambientale
- ✓ Quando prelevare
- ✓ Dove prelevare
- ✓ Come prelevare
- ✓ Materiali monouso e diluenti
- ✓ Metodi di analisi



INTRODUZIONE

- ✓ La contaminazione ambientale da *Listeria monocytogenes* rappresenta uno dei principali fattori di rischio per la produzione di alimenti RTE sicuri
- ✓ La gestione di *Listeria monocytogenes* negli alimenti risulta particolarmente complessa essendo in grado di sopravvivere e proliferare in condizioni avverse.
- ✓ E' stato, quindi, necessario implementare strategie per tenere sotto controllo la presenza e la distribuzione della contaminazione da *Listeria monocytogenes* negli ambienti di lavorazione



INTRODUZIONE

- ✓ **ISO 18593.** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs
- ✓ Un'indagine condotta nel 2010 in UE sulle procedure di campionamento adottate sia per il autocontrollo sia per il controllo ufficiale, ha mostrato una grande varietà di metodi.



INTRODUZIONE

- ✓ Laboratorio di riferimento dell'Unione europea per *Listeria monocytogenes*
- ✓ WG di 20 rappresentanti da 7 stati membri dell'UE, 3 NRL e altri enti.



SCOPO DEL CAMPIONAMENTO

Fornire un supporto per l'individuazione di dove, come e quando eseguire il campionamento per la ricerca di *Listeria monocytogenes* sulle superfici delle aree di trasformazione e sulle attrezzature utilizzate per gli alimenti ready-to-eat



SCOPO DEL CAMPIONAMENTO



ULTERIORI CONSIDERAZIONI:

- ✓ Le superfici e le attrezzature non sono gli unici punti da sottoporre a monitoraggio. Lo schema di campionamento dovrebbe comprendere anche coadiuvanti tecnologici (l'aria compressa, ghiaccio, soluzione salina, acqua, acqua di scarico), le cui tecniche di campionamento non sono oggetto di questo documento.
- ✓ Non viene presa in considerazione la frequenza di campionamento, il numero dei punti di campionamento, la formazione di pool.
- ✓ Non sono progettati per valutare l'efficienza di pulizia e disinfezione.



DOVE PRELEVARE



Per identificare le superfici da campionare:

- ✓ Includere le superfici su cui l'alimento è esposto alla contaminazione (con maggior frequenza), ma anche aree per le quali si può ipotizzare una minor contaminazione (es. aree di stoccaggio) (meno frequentemente).
- ✓ La scelta del sito di campionamento deve basarsi sull'analisi dei dati storici e dell'esame delle fasi del processo produttivo
- ✓ Oltre alle superfici visibilmente pulite, devono essere privilegiati i luoghi umidi e sporchi, difficili da raggiungere



DOVE PRELEVARE

Superfici non a contatto con alimenti:

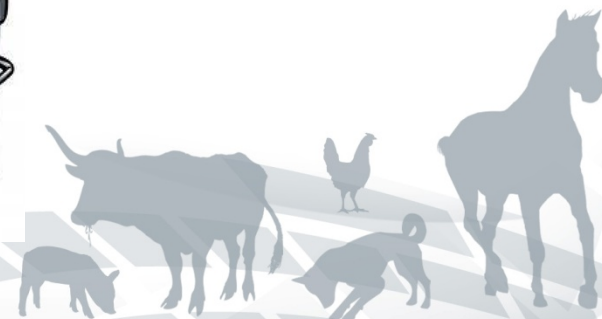
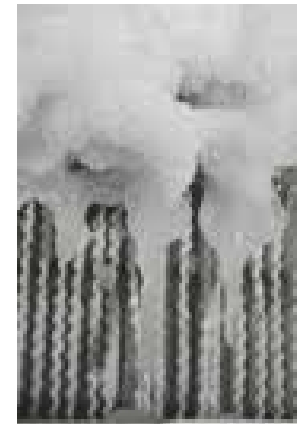
- ✓ fognature, pavimenti, pareti, soffitti,
- ✓ strumenti per la pulizia, aree di lavaggio, impianti di pesatura a pavimento, tubi, rulli dei nastri trasportatori, muletti, attrezzature, pannello di comando, carrelli, congelatori, macchine del ghiaccio



DOVE PRELEVARE

Superfici non a contatto con alimenti:

- ✓ punti freddi dove l'acqua si condensa e unità di raffreddamento: vaschette di raccolta della condensa, alette di raffreddamento in condensatori, dispositivi di raffreddamento
- ✓ guarnizioni in gomma
- ✓ bidoni della spazzatura, contenuti di aspirapolvere,
- ✓ maniglie e rubinetti.
- ✓ grembiuli
- ✓ aree di ristagno d'acqua



DOVE PRELEVARE

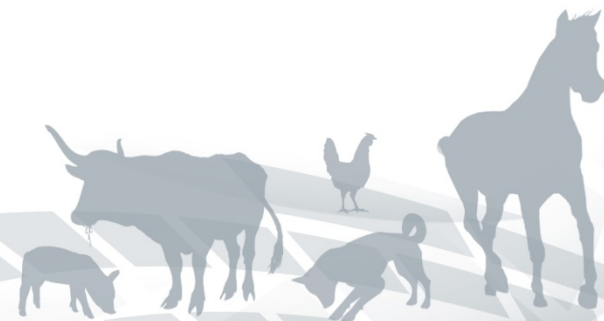
Superfici a contatto con alimenti:

- ✓ nastri trasportatori, affettatrici, taglieri, cubettatrici, tramogge, trituratorini, miscelatori, pelatrici, attrezzature per il riempimento e confezionamento,
- ✓ contenitori, utensili,
- ✓ guanti non monouso.



DOVE PRELEVARE

- ✓ L'area da campionare deve essere più ampia possibile: 1000 - 3000 cm²
- ✓ Le dimensioni dell'area campionata deve essere costante in modo da poter confrontare i dati e monitorare nel tempo la tendenza

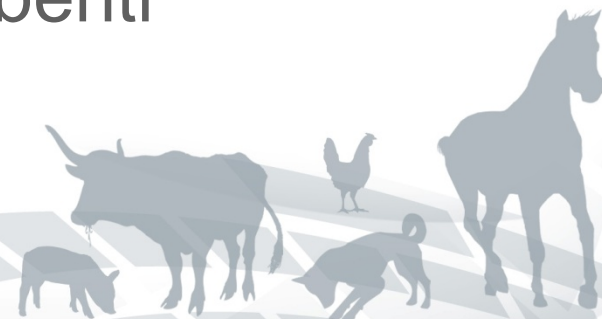


DOVE PRELEVARE

- ✓ Spugnette, tessuti, tampone di garza, sono da preferire per superfici estese



- ✓ Per le aree difficili da raggiungere utilizzare i tamponi a bastoncino da strofinare energicamente e molto assorbenti



DOVE PRELEVARE

- ✓ Delimitatori e righelli graduati sono da evitare (possibile fonte di contaminazione e se non correttamente disinfettati possono interferire con il test)



QUANDO PRELEVARE



Mai subito dopo la pulizia in quanto gli agenti chimici utilizzati per la deterzione/disinfezione possono causare danni alle cellule che non risultano, quindi, rilevabili con metodi colturali



Durante la lavorazione, almeno due ore dopo l'inizio della lavorazione o a fine turno



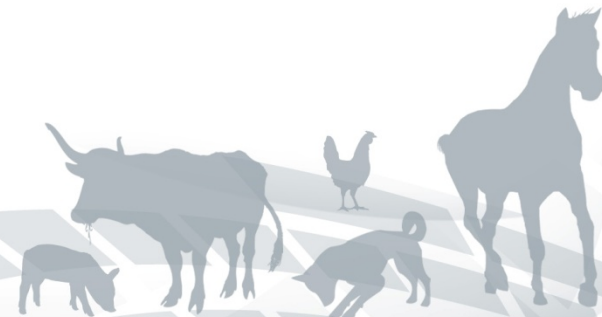
MATERIALE

- ✓ Tampone a bastoncino
- ✓ Spugnette, tessuti o garze

- ✓ Guanti sterili



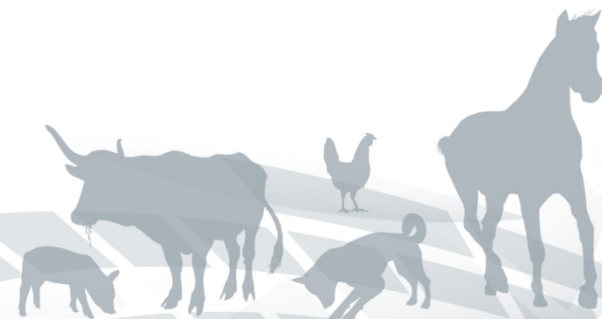
- ✓ Contenitore isotermico, accumulatori di freddo



DILUENTI

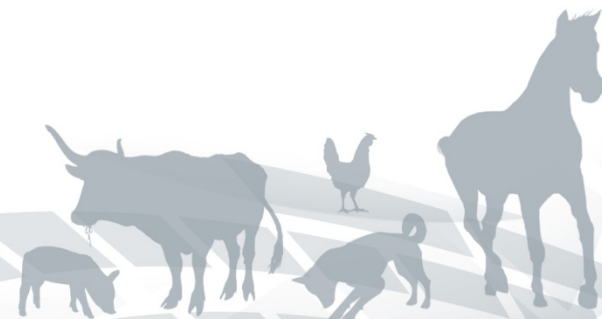
- ✓ Soluzione peptonata (1 g/l)
- ✓ Soluzione Ringer's (1/4 della concentrazione tipica)

Le soluzioni vengono distribuite in provette o bottiglie e sterilizzate a 121°C per 15 minuti



DILUENTI

- ✓ Si raccomanda di non utilizzare **diluenti neutralizzanti** o **PBS** in quanto potrebbero avere effetto negativo sulla coltivabilità di cellule batteriche stressate da condizioni sfavorevoli ambientali.
- ✓ Brodo Fraser o demi-Fraser non devono essere utilizzati come diluenti in quanto potrebbero favorire la crescita di *Listeria monocytogenes* nel sito di trattamento.



DILUENTI

- ✓ Soluzioni neutralizzanti dovrebbero essere selezionati in funzione delle sostanze residue.
- ✓ Non esiste quindi un prodotto «universale». La ISO 18593 riporta un diluente utilizzabile in molte situazioni



PREPARAZIONE TAMPONI



Tamponi a bastoncino:

- ✓ Preparati in laboratorio
- ✓ umidificati con il diluente ma non gocciolanti
- ✓ Collocati in provette sterili e ben chiuse

Altri tipi di tamponi:

- ✓ Preparati in laboratorio
- ✓ umidificati con il diluente ma non gocciolanti
- ✓ Il volume di diluente utilizzato deve essere registrato
- ✓ Collocati in buste sterili e ben chiuse

Nota: le operazioni di umidificazione delle spugnette possono essere eseguite in azienda utilizzando provette monodose del diluente.



TRASPORTO & CONSERVAZIONE

Requisiti da ISO 7218/2007:

- ✓ Il campione deve essere inviato in laboratorio in un contenitore in grado di garantire una temperatura di tra 1° e 8 °C.
- ✓ Stoccaggio presso il laboratorio tra 1° a 5°C
- ✓ L'analisi deve essere eseguita entro 24 h dall'arrivo e non oltre 36 h dal prelievo.
- ✓ La durata della conservazione del campione prima dell'analisi deve essere registrata e riportata sul rapporto di prova



PREPARAZIONE & ANALISI

Tampone a bastoncino

- ✓ aggiungere 9 ml di demi Fraser e agitare in un mixer per 30 sec
- ✓ eseguire la ricerca di *Listeria monocytogenes* secondo la norma EN ISO 11290-1 o metodo alternativo validato.



PREPARAZIONE & ANALISI

Altri tipi di tampone

- ✓ aggiungere un volume di demi Fraser pari a **9 volte** il peso del tampone inumidito nella busta che lo contiene
- ✓ il tampone deve essere completamente immerso nel brodo di coltura
- ✓ trattato in uno omogeneizzatore peristaltico per 60 sec
- ✓ eseguire la ricerca di *Listeria monocytogenes* secondo la norma EN ISO 11290-1 o di un metodo alternativo validato.



ESITO DELLA PROVA

I risultati devono essere riportati come:

Presenza o assenza di *Listeria monocytogenes*

Indicare, se noto, la dimensione dell'area campionata.



INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La valutazione dei risultati deve essere condotta sulla base delle informazioni utilizzate per la definizione del piano di campionamento ambientale per rilevare tendenze e individuare l'origine della contaminazione:

- ✓ Negli impianti di produzione nei quali le materie prime non subiscono trattamenti in grado di ridurre il livello di contaminazione, la positività per *Listeria monocytogenes* riscontrata in un campione di superficie può avere origine sia ambientale che dalla materia prima
- ✓ Negli impianti di produzione in cui prodotti pastorizzati o materie prime trattate per ridurre il livello di contaminazione, la positività per *Listeria monocytogenes* in un campione superficie può essere considerata di origine ambientale



GRAZIE PER L'ATTENZIONE

