

Determinazione dell'attività sanificante del sistema SUNOX™ (Pure-Health™) indotta dal TiO₂ su superfici contaminate da *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

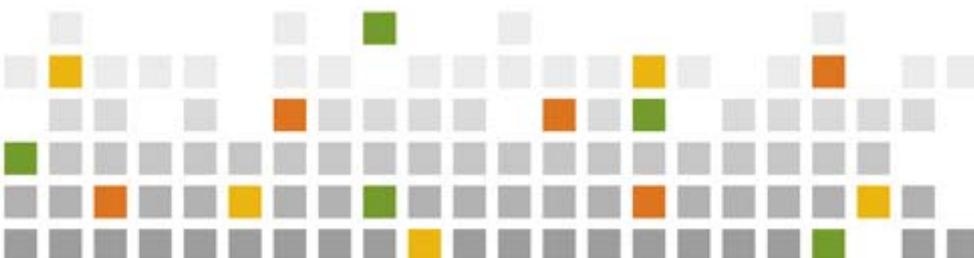
RELAZIONE TECNICA

Giugno 2013

BOZZA

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
2. PREPARAZIONE DEGLI INOCULI	4
3. PREPARAZIONE DELLE UNITA' DI PROVA E RACCOLTA.....	4
4. RISULTATI SPERIMENTAZIONE LISTERIA MONOCYTOGENES	6
5. RISULTATI SPERIMENTAZIONE STAPHYLOCOCCUS AUREUS	8
6. RISULTATI SPERIMENTAZIONE PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	10
7. CONCLUSIONI	11



BOZZA

1. INTRODUZIONE

Una delle principali cause della contaminazione batterica degli alimenti è il contatto con superfici che passivamente trasferiscono agenti batterici sul prodotto alimentare. Le materie prime, i semilavorati e prodotti non confezionati possono essere così inquinati sia da germi la cui proliferazione determina alterazione organolettica dell'alimento e ne abbrevia il periodo di shelf life (batteri alteranti) sia da agenti patogeni che possono essere all'origine di episodi di infezione alimentare nel consumatore. Le preparazioni pronte per il consumo rappresentano la categoria di alimenti maggiormente a rischio perché, se contaminati da agenti patogeni, non sono in seguito sottoposti a trattamento termico prima di essere consumati.

La pulizia e sanificazione delle superfici di lavoro, utensili e ripiani di appoggio rappresentano, quindi, un punto critico nella gestione giornaliera della sicurezza igienico delle aree di produzione, stoccaggio, vendita e somministrazione degli alimenti.

Obiettivo della sperimentazione è stato quello di valutare l'efficacia dell'attività sanificante derivante dall'azione del TiO₂ nei confronti di alcuni microrganismi selezionati tra gli alteranti (*Pseudomonas aeruginosa*) e tra gli agenti patogeni (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) di frequente riscontro negli ambienti di produzione e manipolazione degli alimenti e di particolare rilevanza in particolare per gli alimenti pronti per il consumo (Ready to eat).

Pseudomonas aeruginosa è un batterio Gram negativo bastoncellare ubiquitario, scarsamente patogeno ma responsabile di alterazioni organolettiche e sensoriali dei prodotti alimentari. Sono caratteristiche le alterazioni di colore che *Pseudomonas* può determinare in funzione della capacità di produrre pigmenti come la piocianina (blu), la fluoresceina (gialla) e la piorubina (rosso mattone).

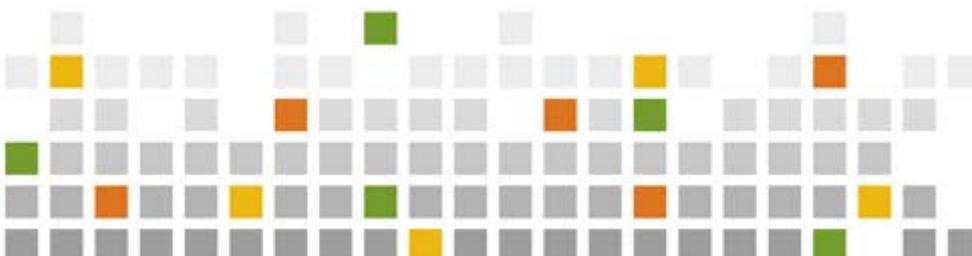
Listeria monocytogenes è un batterio Gram positivo bastoncellare, capace di crescere in condizioni ambientali sfavorevoli. Resiste molto bene alle basse e alle alte temperature e all'essiccamento. In particolare, moltiplica a temperature tra -1,5° e 45° C, a pH tra 4,3 e 9,6 ed a valori di aw fino a 0,90. È l'agente eziologico della listeriosi, malattia a bassa prevalenza ma elevata mortalità soprattutto per le categorie a rischio (neonati, anziani, immunocompromessi). La listeriosi è trasmessa principalmente per via alimentare e i prodotti pronti per il consumo rappresentano la categoria di prodotti più frequentemente contaminati. La fonte di contaminazione più rappresentativa dei prodotti alimentari da parte di *Listeria monocytogenes* è il contatto con superfici di lavoro e attrezzature contaminate. La capacità di persistere e diffondersi nell'ambiente rappresenta a tutt'oggi una delle principali problematiche di sicurezza per il settore produttivo alimentare.

Staphylococcus aureus è un batterio Gram positivo coccoide, in grado di determinare infezioni nell'uomo locali o sistemiche. Per la sicurezza alimentare sono d'interesse i ceppi enterotossigeni, cioè in grado di produrre enterotossine, termostabili negli alimenti contaminati, e causa di seri eventi d'intossicazioni alimentari. Questo microrganismo può essere trasmesso dagli operatori attraverso la manipolazione diretta dei prodotti ma anche apparecchiature e superfici ambientali possono essere fonti di contaminazione da *Staphylococcus aureus*.

Tutte le specie sopraelencate sono, inoltre, capaci di formare biofilm microbico, ovvero strutture di cellule batteriche racchiuse in matrici polimeriche autoprodotte ed adese a superfici inerti.

Il biofilm garantisce la sopravvivenza e, quindi, la persistenza di microrganismi in ambienti ostili, impedendo l'azione disinfettante dei prodotti impiegati nelle operazioni di sanificazione delle superfici e degli ambienti di lavorazione. Inoltre, in una fase successiva la frammentazione di questa struttura garantisce la diffusione di microrganismi nell'ambiente di lavoro che possono, quindi, ricontaminare il prodotto alimentare.

Le prove sperimentali sono state condotte utilizzando ripiani di appoggio trattati con una vernice contenente TiO₂ e montati in una cella frigorifera.



BOZZA

L'attività sanificante riconducibile all'azione del TiO₂ è stata determinata quantificando la riduzione della carica batterica presente sulle superfici dei ripiani di appoggio artificialmente contaminati con ceppi di *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

2. IL SISTEMA DI DISINFEZIONE SUNOX™

Il sistema di disinfezione SUNOX™ della Next Technology Tecnotessile Srl (commercializzato anche dalla Orion Srl con il marchio Pure-Health™) è un sistema di allestimento ambienti, che impiega nuovi materiali fotocatalitici e lampade a spettro completo di luce fluorescente. Nel caso specifico, il sistema è costituito da una cella frigo (in cui pareti, pavimento e cielo sono realizzati con gelcoat per alimenti con proprietà fotocatalitica) e da una serie di ripiani di appoggio per gli alimenti, anch'essi realizzati in gelcoat per alimenti con proprietà fotocatalitica. All'interno della cella sono presenti 4 punti luce, tutti posizionati sul cielo, dotati di lampade a spettro completo di luce fluorescente.

3. PREPARAZIONE DEGLI INOCULI

Per l'allestimento degli inoculi sono stati utilizzati i seguenti ceppi batterici: *L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* ATCC 33862 e *P. aeruginosa* ATCC27853.

Di ogni ceppo è stata allestita una sospensione a partire da una colonia seminata su agar nutritivo. Da questa coltura è stata prelevata una colonia risospesa in brodo Brain Heart Infusion (BHI) posto a incubare a 37°C per *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* e a 30°C per *Pseudomonas aeruginosa* per un periodo di 16 – 18 ore.

La concentrazione della brodocoltura è stata titolata su terreno selettivo ALOA per *Listeria monocytogenes*, Baird Parker agar per *Staphylococcus aureus* mentre per *Pseudomonas aeruginosa* è stato utilizzato il CFC Agar.

4. PREPARAZIONE DELLE UNITÀ DI PROVA E PRELIEVO DEI CAMPIONI

Sono stati sottoposti ad analisi 3 ripiani di appoggio verdi (non trattati) e 3 rossi (trattati) collocati all'interno della cella frigorifera.

Su ogni tipo di ripiano sono state delimitate aree di 100 cm² in numero sufficiente da poter eseguire in doppio ogni rilevazione stabilita. Su ognuna delle due pareti utilizzate i piani sono stati posti alla stessa altezza e distanziati l'uno dall'altro di circa 52 cm (foto 1 e 2).

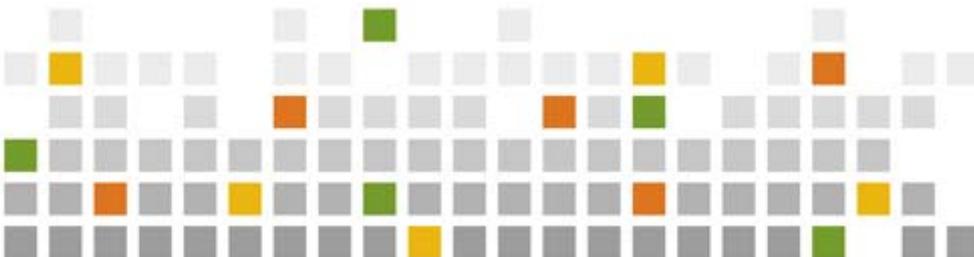
Le prove di contaminazione sono state eseguite contaminando le aree delimitate con un solo microorganismo. Le unità di prova sono state contaminate con 1 ml della sospensione allestita con il ceppo batterico, distribuita omogeneamente su tutta la superficie.

Prima di procedere alla raccolta e relativa titolazione al tempo "0", le aree contaminate sono state lasciate asciugare per 10 minuti. Il prelievo è stato eseguito utilizzando 3 tamponi in alginate per ogni area.

Al termine dell'operazione, i tamponi sono stati immersi in una provetta contenente 10 ml di diluente.

La cella frigorifera è stata impostata a 12°C e con luce continua per tutta la durata della sperimentazione.

I prelievi sono stati eseguiti subito dopo la contaminazione dell'unità di prova e dopo 3, 9, 12, 24 e 48 ore.



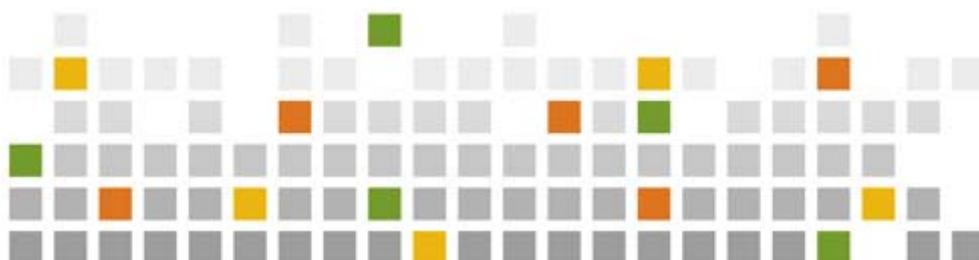
BOZZA



Foto 1 Allestimento delle aree delimitate (unità di prova) per i ripiani rossi



Foto 2 Allestimento delle aree delimitate (unità di prova) per i ripiani rossi



BOZZA



Foto 3 Disposizioni dei ripiani all'interno della cella frigorifera

Nella tabella 1 è riportato il calendario dei prelievi, il numero e la disposizione dei campioni analizzati.

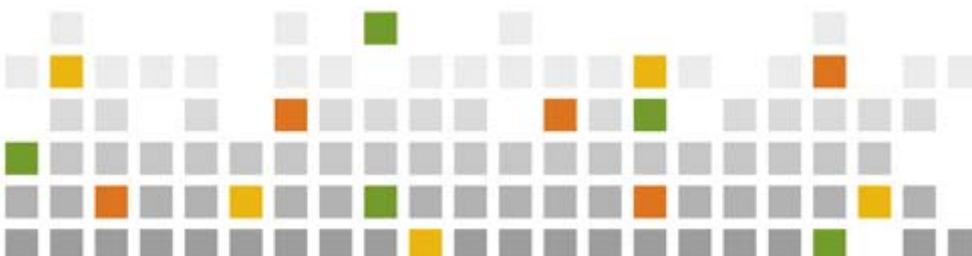
Tempi	Pianali trattati			Pianali non trattati		
	superiore	medio	inferiore	superiore	medio	Inferiore
T=0	2 superfici					
T=3	2 superfici	2 superfici	2 superfici	2 superfici	2 superfici	2 superfici
T=9	2 superfici	2 superfici	2 superfici	2 superfici	2 superfici	2 superfici
T=12	2 superfici	2 superfici	2 superfici	2 superfici	2 superfici	2 superfici
T=24	2 superfici	2 superfici	2 superfici	2 superfici	2 superfici	2 superfici
T=48	2 superfici	2 superfici	2 superfici	2 superfici	2 superfici	2 superfici

Tabella 1. Calendario dei prelievi

5. RISULTATI SPERIMENTAZIONE PER LISTERIA MONOCYTOGENES

La titolazione della sospensione del ceppo di *Listeria monocytogenes* ha fornito una concentrazione iniziale di 7×10^6 UFC/ml.

I dati relativi alle cariche batteriche rilevate ad ogni prelievo e per ogni ripiano sono riportate in tabella 2. I valori di carica batterica rilevati sono espressi come logaritmi.



BOZZA

Punto di prelievo	T0	T3	T9	T12	T24	T48	
1° pianale verde	7,00	7,13	5,57	4,41	5,60	5,31	
2° pianale verde		7,16	6,23	4,91	5,37	5,84	
3° pianale verde		6,75	5,86	5,37	4,56	4,44	
1° pianale rosso		0	0	0	0	0	
2° pianale rosso		5,13	3,24	2,45	0	0	
3° pianale rosso		7,00	6,06	5,12	5,12	5,87	5,46

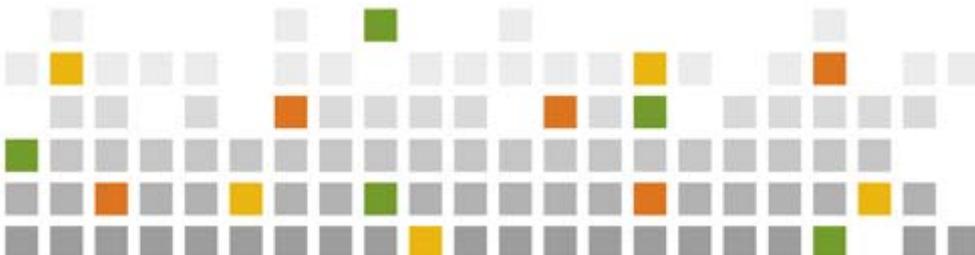
Tabella 2. Valore medio della carica batterica per *Listeria monocytogenes* rilevata nel corso del periodo di sperimentazione

L'andamento della carica di *Listeria monocytogenes*, rilevata sui ripiani non trattati e trattati, sono riportati rispettivamente nel grafico 1 e 2.



Grafico 1. Andamento della carica di *Listeria monocytogenes* rilevata sui ripiani non trattati.

Per quanto riguarda i ripiani non trattati, la carica batterica di *Listeria monocytogenes* ha subito una riduzione progressiva per tutto il periodo di prova. La riduzione maggiore è stata rilevata per il ripiano posto in basso (1,69 log) anche se mentre per quello intermedio e superiore la riduzione è di poco inferiore (rispettivamente 1,16 log e 1,56 log). L'effetto di tale riduzione è comunque riconducibile prevalentemente alla disidratazione della superficie.



BOZZA

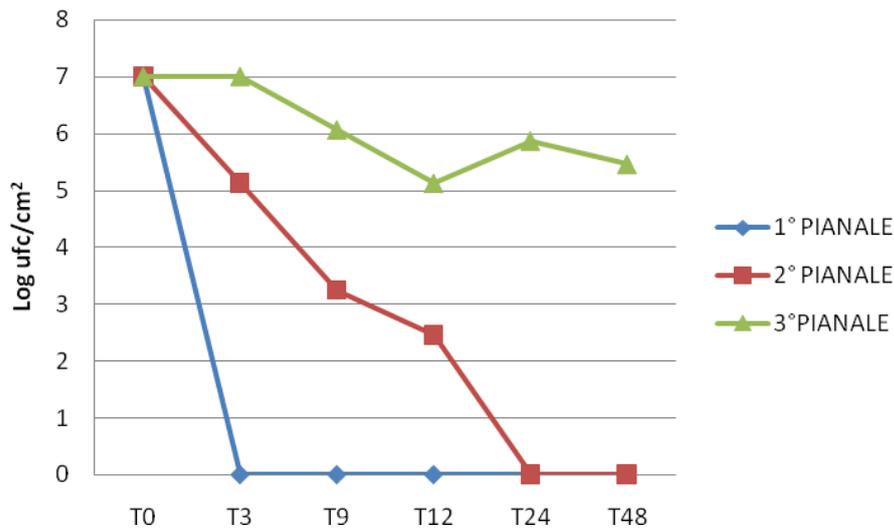


Grafico 2. Andamento della carica di *Listeria monocytogenes* rilevata sui ripiani trattati.

I dati ottenuti per i ripiani trattati mettono in evidenza una rapida riduzione della carica contaminante. Per il ripiano superiore è stata rilevata una riduzione di 7 log nell'arco del primo intervallo di misurazione (3 ore) che non ha permesso di rilevare cellule batteriche residue sulla superficie.

Lo stesso livello di riduzione è stato rilevato per il ripiano intermedio che però è stato raggiunto nell'arco delle prime 24 ore. L'effetto risulta meno evidente per il ripiano inferiore dove la riduzione al termine del periodo di sperimentazione è di 1,54 log.

6. RISULTATI SPERIMENTAZIONE PER STAPHYLOCOCCUS AUREUS

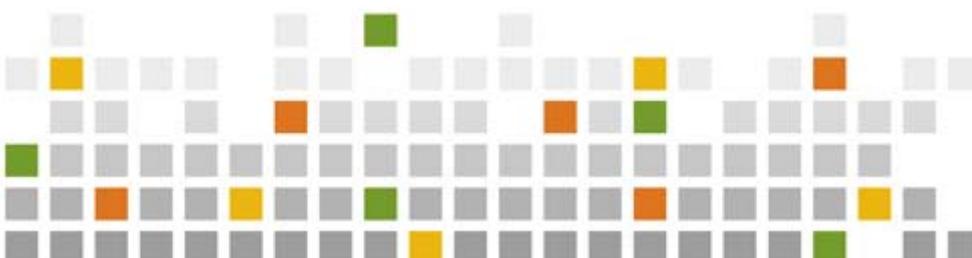
La concentrazione della sospensione iniziale del ceppo di *Staphylococcus aureus* era di $7,9 \times 10^8$ UFC/ml.

I dati relativi alle cariche rilevate ad ogni prelievo e per ogni ripiano sono riportate in tabella 3. I valori di carica batterica rilevati sono espressi come logaritmi.

Punto di prelievo	T0	T3	T9	T12	T24
1° pianale verde	6,95	7.19	7.89	6.91	6.95
2° pianale verde		7.26	7.92	6.92	6.92
3° pianale verde		5.14	5.32	6.08	6.12
1° pianale rosso		3.48	2.58	1.88	0
2° pianale rosso		3.69	2.81	2.47	2.58
3° pianale rosso		5.28	5.66	5.72	6.78

Tabella 3. Valore medio della carica batterica per *Staphylococcus aureus* rilevata nel corso del periodo di sperimentazione

L'andamento della carica di *Staphylococcus aureus*, rilevata sui ripiani non trattati e trattati, sono riportati rispettivamente sul grafico 4 e 5.



BOZZA

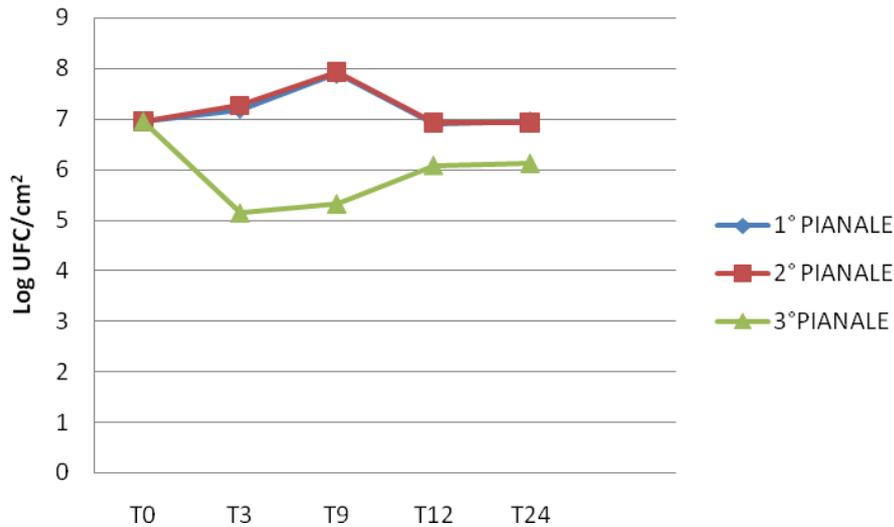


Grafico 4. Andamento della carica di *Staphylococcus aureus* rilevata sui ripiani non trattati.

La carica batterica di *S. aureus* rilevata sui ripiani non trattati subisce una riduzione finale praticamente nulla per il ripiano superiore e intermedio mentre per quello posto più in basso è di poco inferiore a 1 log (0,83 log). L'effetto di tale riduzione è comunque riconducibile prevalentemente alla disidratazione della superficie.

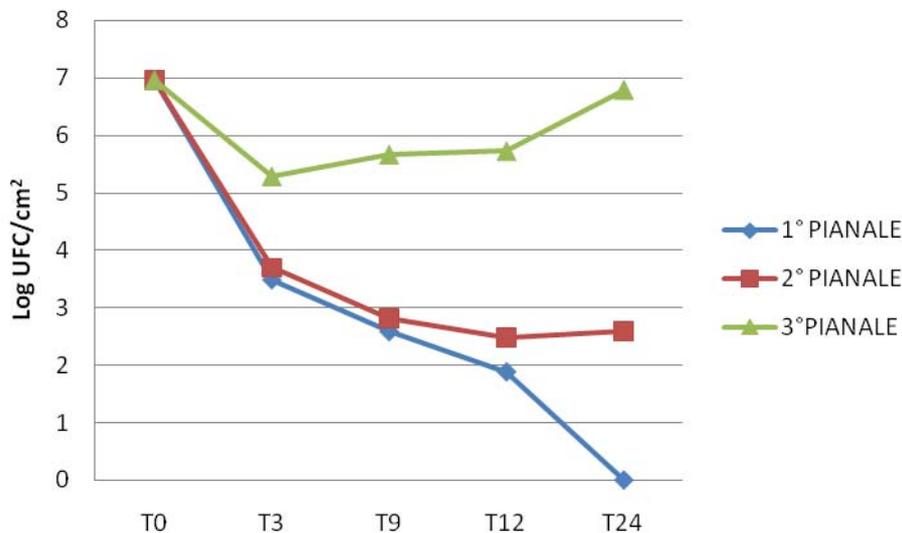
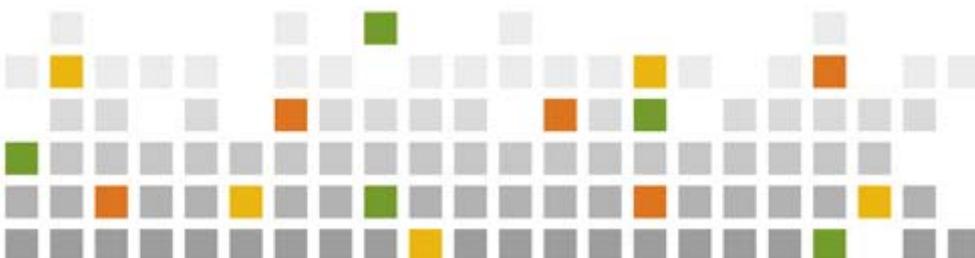


Grafico 5. Andamento della carica di *Staphylococcus aureus* rilevata sui ripiani trattati.

Per i ripiani trattati le cariche subiscono una rapida riduzione a partire dalle prime ore dopo la contaminazione. Per il ripiano superiore la riduzione progressiva è stata continuativa fino al completo annullamento della carica contaminante per una riduzione complessiva di 6,95 log in 24 ore.

Per il ripiano intermedio la riduzione massima (4,37 log) si raggiunge a 24 ore mentre l'effetto risulta irrilevante per il ripiano inferiore dove la riduzione al termine del periodo di sperimentazione è di 0,17 log.



7. RISULTATI SPERIMENTAZIONE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

La titolazione del ceppo di *Pseudomonas aeruginosa* ha rilevato una concentrazione batterica pari a $1,3 \times 10^9$ UFC/ml.

I dati relativi alle cariche rilevate ad ogni prelievo e per ogni ripiano sono riportate in tabella 4. I valori di carica batterica rilevati sono espressi come logaritmi.

Punto di prelievo	T0	T3	T9	T12	T24	T48
1° pianale verde	8,25	7,00	6,56	6,91	6,67	6,55
2° pianale verde		7,29	6,68	6,92	6,51	6,00
3° pianale verde		6,09	5,67	7,08	6,41	6,13
1° pianale rosso		5,72	5,05	2,73	2,09	2,03
2° pianale rosso		5,45	4,39	3,80	4,40	4,81
3° pianale rosso		6,59	6,54	5,78	5,68	4,86

Tabella 4. Valore medio della carica batterica per *Pseudomonas aeruginosa* rilevata nel corso del periodo di sperimentazione

L'andamento della carica di *Pseudomonas aeruginosa*, rilevata sui ripiani non trattati e trattati, sono riportati rispettivamente sul grafico 6 e 7.

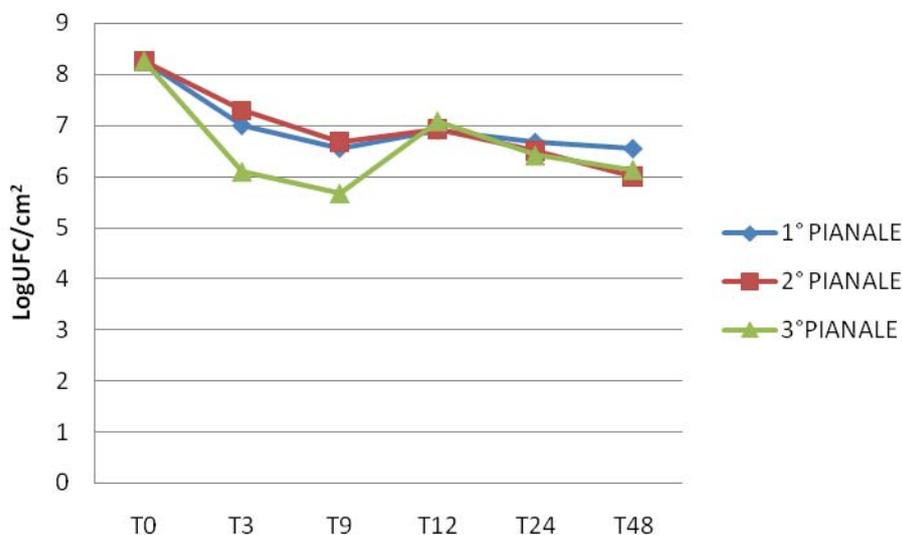
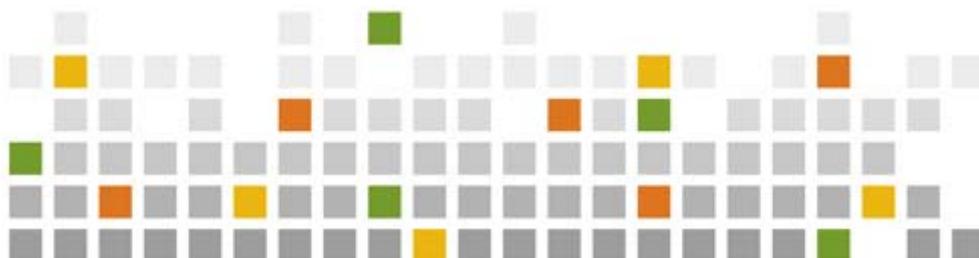


Grafico 6. Andamento di *Pseudomonas aeruginosa* rilevata sui ripiani non trattati.

I risultati della carica batterica di *P. aeruginosa* rilevata sui ripiani non trattati mette in evidenza una riduzione finale pressochè sovrapponibile per il ripiano intermedio e quello inferiore (rispettivamente 2,25 log e 2,12 log) mentre per il ripiano superiore la riduzione rilevata è di 1,70 log. L'effetto di tale riduzione è comunque riconducibile prevalentemente alla disidratazione della superficie.



BOZZA

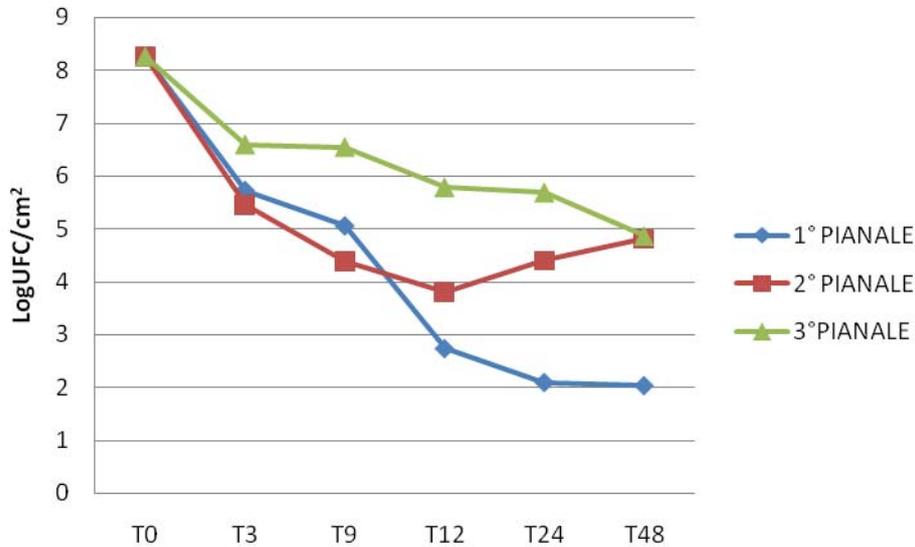


Grafico 7. Andamento di *Pseudomonas aeruginosa* rilevata sui ripiani trattati.

Per i ripiani trattati le cariche hanno subito una rapida riduzione nell'arco delle prime 12 ore mentre la velocità di decadimento della carica diminuisce nel periodo restante di sperimentazione. Per il ripiano superiore la riduzione è stata continuativa fino a 24 ore dalla contaminazione mentre nell'ultimo periodo è evidente una stabilizzazione della carica residua. L'effetto sanificante ha determinato una riduzione complessiva di 6,22 log in 48 ore. Per il ripiano intermedio e quello inferiore le riduzioni sono risultate di entità sovrapponibile (rispettivamente 3,44 log e 3.39 log).

8. CONCLUSIONI

Sulla base delle misurazioni effettuate l'effetto sanificante delle superfici dei ripiani trattati è evidente. Risultati ottimali sono stati raggiunti nei confronti della *Listeria monocytogenes* (riduzione di 7 log entro le prime 3 ore di esposizione) e dello *Staphylococcus aureus* (riduzione di 7 log entro le prime 24 ore di esposizione). L'efficacia del sistema è stata rilevata anche per lo *Pseudomonas aeruginosa* per il quale è stato registrato un abbattimento di 6,22 log in 48 ore.

Occorre considerare che le cariche contaminanti presenti sulle superfici di lavoro soprattutto per quanto riguarda gli agenti patogeni non sono mai elevate come quelle impiegate nella sperimentazione. L'impiego di alte concentrazioni ha permesso di determinare la capacità sanificante di una sostanza attraverso la misurazione della riduzione del numero di log della carica iniziale.

Va, comunque, segnalata la disomogeneità dell'effetto sanificante rilevato sui ripiani di appoggio in funzione della loro collocazione (in alto, intermedio e in basso). La minor efficacia rilevata già a partire dal ripiano intermedio richiederà una revisione della collocazione delle lampade in modo da garantire una più omogenea esposizione delle superfici di appoggio.

