

## RELAZIONE FINALE

### Valutazione della cinetica di ricontaminazione microbica di una superficie dopo l'uso di BluEsprit® igienizzante a base di eucaliptolo

Le prove sono state realizzate con lo scopo di:

- Valutare la cinetica di ricontaminazione microbica su 1 superficie (Interno di un furgone) con campionamento prima del trattamento pulente con BluEsprit® Eucaliptolo e dopo il trattamento, ai tempi 0 -7-15 giorni, e per 1 diluizione di prodotto.

### CAMPIONAMENTO

La superficie di riferimento utilizzata è quella interna della parte di carico di un furgone ad uso trasporto merce.

La superficie di riferimento è stata campionata secondo le modalità sopra descritte da parte dell'operatore per la valutazione della carica microbica iniziale. La superficie è stata pulita utilizzando il prodotto Blu Esprit, alla diluizione consigliata per l'uso, ed il panno forniti dal Cliente.

La superficie è stata ricampionata subito dopo, e dopo 7 e 15 giorni. Nel periodo tra i campionamenti il furgone è stato utilizzato per la normale attività di trasporto cui è destinato.

### CONDIZIONI OPERATIVE

Per la valutazione della contaminazione pre- e post- trattamento pulente della superficie di riferimento causata dalla deposizione del bioaerosol sospeso nell'aria e dall'eventuale contatto con l'uomo o materiali contaminati, è stata utilizzata la metodica dell'applicazione di piastre Petri di tipo a contatto (Liofilchem Diagnostici Srl, Teramo). Si tratta di piastre con diametro di 55 mm (superficie 24 cm<sup>2</sup>) e fondo grigliato. Sono riempite con terreno agarizzato a formare una superficie convessa e sono identificate con il nome commerciale di RODAC (Replicate Organism Detection And Counting).

Secondo quanto previsto dalle Linee Guida CONTARP-INAIL per il campionamento e l'analisi finalizzati al monitoraggio microbiologico negli ambienti di lavoro (INAIL, 2010), è stata effettuata la rilevazione quantitativa della:

- carica batterica totale psicrofila (crescono e si moltiplicano tra 0 e 20° C)
- carica batterica totale mesofila (temperatura ottimale di crescita tra 25 e 45° C)
- carica fungina totale (con inibizione della carica batterica)

Tutte le determinazioni sono eseguite in triplo, in tre punti significativi della superficie per la valutazione dei livelli medi di contaminazione, ed espresse come *media ± deviazione standard* dei risultati ottenuti. Poiché la superficie da campionare era verticale, le piastre sono state appoggiate sulla superficie applicando una pressione non standardizzata da un peso di riferimento, ma utilizzando la pressione della mano dell'operatore, per un tempo determinato (10 secondi).

### *Terreni di coltura e parametri di incubazione*

I terreni sono già inseriti nelle piastre sterili, e adatti per la crescita dei microrganismi da monitorare:



Parametro	Terreno	Diametro piastre (mm)	Temp. di incubazione (°C)	pH
Conta batterica totale psicofila	Plate Count Agar (PCA) <sup>#1</sup>	55	22.0-25.0 ± 0.1 °C	7.0 ± 0.2
Conta batterica totale mesofila	Plate Count Agar (PCA) <sup>#1</sup>	55	37.0 ± 0.1 °C	7.0 ± 0.2
Conta fungina totale con inibizione della flora batterica	Sabouraud Agar + Cloramfenicolo (SAB c) <sup>#2</sup>	55	22.0-25.0 ± 0.1 °C	5.6 ± 0.2

Le piastre a 37°C sono state incubate sotto camera termostata per il tempo necessario all'esecuzione della prova e prelevate soltanto per la conta delle colonie ai tempi prefissati (24-48-72 ore).

Le piastre a 22-25°C sono state incubate a temperatura ambiente poiché le condizioni di temperatura del laboratorio erano costantemente (nel periodo delle prove) entro l'intervallo.

#### Composizione dei terreni di coltura

##### #1 PCA

0.5% peptone

0.25% yeast extract

0.1% glucose

1.5% agar

Il PCA viene impiegato per la determinazione della carica microbica totale su superfici piane e/o nell'aria.

##### #2 SAB c

0.5% digerito peptico di tessuto animale

0.5% digerito pancreatico di caseina

4.0% glucosio

50 mg/L cloramfenicolo

1.5% agar

Il SAB c viene impiegato per l'isolamento, la coltura e conservazione dei funghi dermatofiti, patogeni e non, dei lieviti e delle muffe. Viene anche utilizzato per rilevare la contaminazione da aspergilli, ad es. negli alimenti.

## IL MICROCLIMA

In concomitanza con i rilievi microbiologici sono state effettuate misurazioni microclimatiche, per rilevare le condizioni ambientali in relazione allo sviluppo dei microrganismi, in particolare temperatura e contenuto di umidità. Il valore di umidità relativa può essere indicativo di condizioni favorevoli allo sviluppo di condensa del vapore d'acqua sulle superfici e quindi di un aumento del rischio di formazione di colonie batteriche e/o fungine.

Per le misurazioni microclimatiche è stato utilizzato un termoigrometro RS-1360° (RS Components, UK). L'ambiente del furgone può considerarsi uniforme e relativamente piccolo. In queste condizioni, il rilievo microclimatico è stato effettuato solo al centro del vano di carico.

Giorno	temperatura (°C)	umidità relativa (%)
0 (16 Maggio 2016)	24°C	42,5%
7 (23 Maggio 2016)	20,8°C	50,5%
15 (30 Maggio 2016)	28.2°C	38,7%

## ANALISI DEI CAMPIONI

### Incubazione delle piastre

Una volta acquisiti i campioni, le piastre sono state incubate capovolte, cioè con il coperchio verso il basso per evitare perdite di umidità che possono danneggiare i microrganismi, nelle opportune condizioni di temperatura per garantire le ottimali condizioni di crescita nei tempi prestabiliti.

### Letture delle piastre

Ai tempi prestabiliti (24-48-72 ore) si è proceduto alla lettura delle piastre, cioè all'osservazione macroscopica delle stesse per il conteggio del numero delle colonie cresciute. I livelli di concentrazione microbica così determinati rappresentano solo approssimazioni delle concentrazioni transitorie dei microrganismi presenti sulla superficie: le condizioni ambientali vigenti e lo stesso campionamento possono, infatti, stressare e/o danneggiare le cellule microbiche mantenendone la vitalità ma inficiandone la coltivabilità in laboratorio. Pertanto, è stato possibile conteggiare solo i microrganismi vitali e coltivabili, con la conseguente possibilità di sottostima della concentrazione microbica reale.

La lettura delle piastre è stata effettuata dall'operatore sotto cappa di sicurezza biologica, e facilitata dall'uso di un pennarello contacolonie per la registrazione del numero di colonie via via contate. Per ottimizzare l'osservazione ad occhio nudo, la lettura è stata effettuata sotto luce diretta.

Tutte le piastre sono state fotografate sotto cappa prima del conteggio e classificate con un codice riportante il nome del campione e il tempo corrispondente di campionamento, per l'archiviazione dei risultati.

Non si è proceduto alla identificazione del genere e della specie microbica cresciuta, in quanto non ritenuto significativo ai fini della determinazione del grado di contaminazione ambientale.

Per la valutazione della crescita batterica (mesofila e psicrofila) si è proceduto alla conta delle sole colonie batteriche, escludendo le eventuali colonie fungine (lieviti e muffe) cresciute nel terreno.

Per la valutazione della carica fungina si è proceduto alla conta dei nuclei che originano le singole colonie fungine visibili (micelio aereo). La lettura è stata effettuata da ambo i lati delle piastre, per consentire l'inclusione nel conteggio di eventuali colonie fungine più piccole (a crescita lenta) o di lieviti oscurati dal micelio aereo dei miceti a crescita rapida.

Per la refertazione dei conteggi sono stati applicati i medesimi criteri utilizzati per i conteggi batterici.

#### Calcolo delle UFC

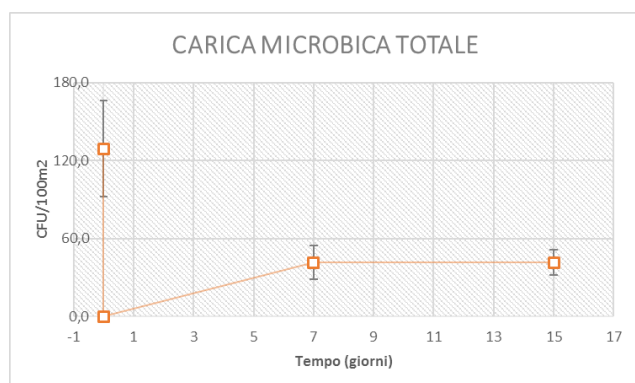
La densità microbica è stata espressa in termini di UFC (Unità Formanti Colonie)/100 cm<sup>2</sup> e calcolata dividendo il risultato del conteggio (N, numero di colonie per piastra) per l'area di contatto della piastra (24 cm<sup>2</sup>) e moltiplicando il risultato per 100:

$$UFC/100cm^2 = N/24 * 100$$

## RISULTATI

### CINETICA DI RICONTAMINAZIONE AI TEMPI 0 – 7 E 15 GIORNI DAL TRATTAMENTO PULENTE

#### - CARICA TOTALE

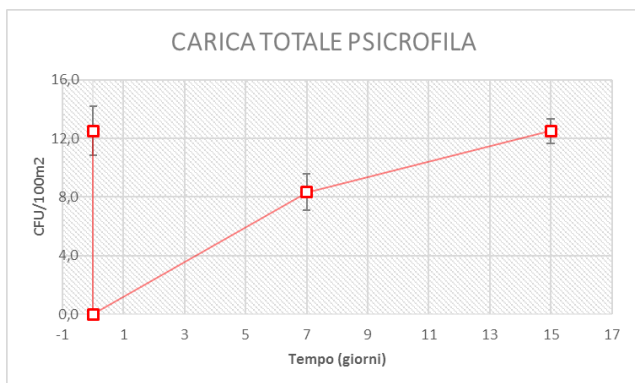


Tempo (giorni)	Carica totale (CFU/100cm <sup>2</sup> )	Ricontaminazione dopo il trattamento pulente (%)	Riduzione rispetto alla contaminazione iniziale (%)
0 (prima del trattamento pulente)	129 ± 37		
0 (dopo il trattamento pulente con BluEsprit®)	0	-	100%
7	42 ± 13	30%	70%
15	42 ± 9	30%	70%

Subito dopo il trattamento pulente il livello di contaminazione si azzerò, indicando una completa efficacia del prodotto nei confronti della rimozione di tutti i microrganismi superficiali esaminati. Dopo 7 giorni, si assiste ad una ricontaminazione dovuta a successivo deposito di microrganismi ambientali, ma comunque ridotta ad un 30% di quella presente prima del trattamento. La contaminazione è stabile anche dopo 15 giorni. Il prodotto, almeno per i 15 giorni successivi al trattamento, mostra un effetto residuo che preserva la superficie dall'aumento del livello di contaminazione.

CINETICA DI RICONTAMINAZIONE AI TEMPI 0 – 7 E 15 GIORNI DAL TRATTAMENTO PULENTE

- CARICA PSICROFILA



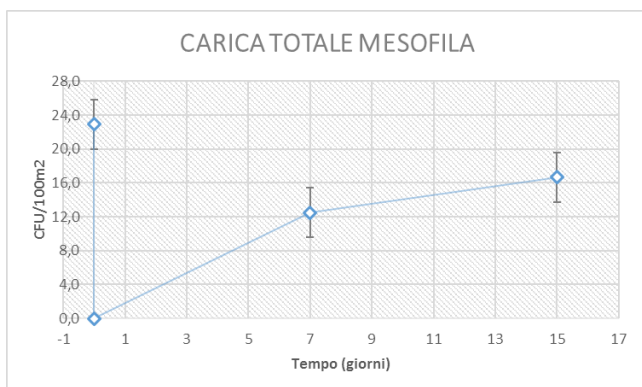
<i>Tempo (giorni)</i>	<i>Carica psicofila (CFU/100cm²)</i>	<i>Ricontaminazione dopo il trattamento pulente (%)</i>	<i>Riduzione rispetto alla contaminazione iniziale (%)</i>
0 (prima del trattamento pulente)	13 ± 2		
0 (dopo il trattamento pulente con BluEsprit®)	0	-	100%
7	8 ± 1	60%	40%
15	12 ± 1	90%	10%

Subito dopo il trattamento pulente il livello di contaminazione si azzerava, indicando una completa efficacia del prodotto nei confronti della rimozione di tutti i microrganismi psicofili superficiali. Dopo 7 giorni, si assiste ad una ricontaminazione dovuta a successivo deposito di microrganismi psicofili ambientali, ma comunque ridotta ad un 60% di quella presente prima del trattamento. La contaminazione dopo 15 giorni torna a livelli intorno al 90% rispetto a quella pre-trattamento pulente.

Il prodotto non mostra effetto residuo sulla carica psicofila, tuttavia essa rappresenta circa il 10% della carica totale, quindi non ha un impatto significativo sulla riduzione complessiva della contaminazione dovuta al trattamento con il prodotto.

CINETICA DI RICONTAMINAZIONE AI TEMPI 0 -7 E 15 GIORNI DAL TRATTAMENTO PULENTE

- CARICA MESOFILA



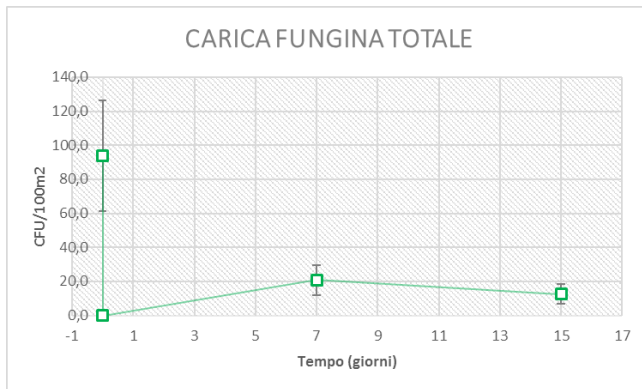
<i>Tempo (giorni)</i>	<i>Carica mesofila (CFU/100cm²)</i>	<i>Ricontaminazione dopo il trattamento pulente (%)</i>	<i>Riduzione rispetto alla contaminazione iniziale (%)</i>
0 (prima del trattamento pulente)	23 ± 4		

0 (dopo il trattamento pulente con BluEsprit®)	0	-	100%
7	13 ± 3	60%	40%
15	16 ± 3	70%	30%

Subito dopo il trattamento pulente il livello di contaminazione si azzerava, indicando una completa efficacia del prodotto nei confronti della rimozione di tutti i microrganismi mesofili superficiali. Dopo 7-15 giorni, si assiste ad una ricontaminazione dovuta a successivo deposito di microrganismi mesofili ambientali, ma comunque ridotta ad un 60-70% di quella presente prima del trattamento.

#### CINETICA DI RICONTAMINAZIONE AI TEMPI 0 – 7 E 15 GIORNI DAL TRATTAMENTO PULENTE

##### - CARICA FUNGINA



Tempo (giorni)	Carica fungina (CFU/100cm²)	Ricontaminazione dopo il trattamento pulente (%)	Riduzione rispetto alla contaminazione iniziale (%)
0 (prima del trattamento pulente)	94 ± 28		
0 (dopo il trattamento pulente con BluEsprit®)	0	-	100%
7	20 ± 8	20%	80%
15	12 ± 4	15%	85%

Subito dopo il trattamento pulente il livello di contaminazione si azzerava, indicando una completa efficacia del prodotto nei confronti della rimozione di tutti i microrganismi mesofili superficiali. Dopo 7-15 giorni, si assiste ad una leggera ricontaminazione dovuta a successivo deposito di microrganismi mesofili ambientali, ma comunque ridotta ad un 20% di quella presente prima del trattamento. I dati ottenuti a 7 e 15 giorni non sono significativamente diversi, perché rientrano nella deviazione standard delle misure. Emerge una notevole efficacia residua del prodotto sulle specie fungine, che sono la specie maggiormente presente nell'ambiente.

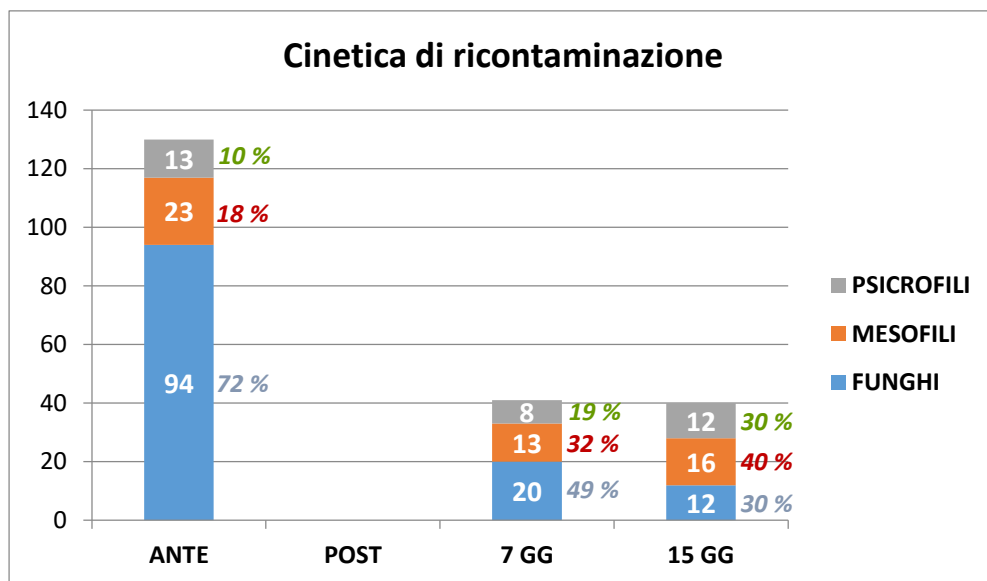
#### DISCUSSIONE

Il prodotto considerato, in associazione all'azione meccanica del panno pulente, è in grado di rimuovere completamente la carica microbica presente sulla superficie presa a campione. Inoltre, la carica microbica totale dopo 15 giorni dal trattamento pulente appare ancora significativamente al di sotto di quella presente prima del trattamento.

Il prodotto testato è perciò in grado di ridurre la ricontaminazione superficiale per tutto il periodo considerato, anche se agisce in maniera differente sulle varie specie microbiche: è più efficace sui funghi e sui batteri mesofili di quanto non sia sui batteri psicrofili, che dopo 15 giorni tornano quasi alla quantità iniziale. Essi

comunque sono in quantità bassa rispetto agli altri, e quindi non hanno un impatto significativo sulla ricontaminazione.

Il grafico seguente mostra le barre con il livello di contaminazione totale iniziale (prima del trattamento pulente), immediatamente dopo il trattamento e quelle dopo 7 e 15 giorni dal trattamento. I numeri all'interno delle barre rappresentano il numero di UFC (unità formanti colonia) per ogni specie microbica mentre, i valori accanto alle barre rappresentano le percentuali di suddivisione della carica totale nelle 3 specie considerate (batteri psicrofili, batteri mesofili e funghi). Come si può vedere la specie maggiormente presente nella carica iniziale sono i funghi, che sono la specie su cui il trattamento è più efficace.



Non sono stati eseguiti test specifici su specie di microrganismi patogeni, i risultati si riferiscono alla carica contaminante ambientale. Non sono stati fatti test specifici sulle spore fungine, la carica è stata determinata sui microrganismi vitali nelle condizioni operative mantenute.

Ferrara, 25 ottobre 2016

Dott.ssa Elena Tamburini

*NOTA: i risultati riportati si riferiscono esclusivamente alla prova effettuata utilizzando il campione di prodotto BluEsprit® Igienizzante a base di eucaliptolo pervenuto presso i laboratori del Dipartimento di Scienze della Vita e Biotecnologie dell'Università di Ferrara. Essi fanno riferimento unicamente al prodotto e alla superficie oggetto della presente relazione, e sono validi unicamente nell'ambito delle condizioni sperimentali testate ed in assenza di modifiche alla composizione del formulato.*