La filosofia HACCP applicata alla micropropagazione delle specie vegetali per ridurre il rischio di contaminazioni microbiche

Flavia GUARIENTO[1], Enrico ROVERE[2]

[1] Consulente di HACCP per l'industria agro-alimentare, 21046 Malnate VA, Via Monte Nero, 2
[2] Micropoli di Rovere Enrico, 20090 Cesano Boscone MI, Via Magellano, 4/6, info@micropoli.it

Keywords: HACCP, coltura *in vitro*, micropropagazione, prevenzione contaminazioni

OBIETTIVO DELL'INDAGINE

La prevenzione delle contaminazioni microbiche nei laboratori di micropropagazione meristematica come nei laboratori di biotecnologie vegetali rappresenta un argomento di costante attenzione da parte degli operatori. La riduzione del fenomeno delle contaminazioni migliora la qualità delle produzioni vegetali in vitro ed aumenta la redditività dei laboratori. Già dagli anni '90 è stato introdotto il concetto di individuare nelle industrie di trasformazione degli alimenti delle zone di rischio e dei punti critici nei trattamenti tecnologici. Il concetto di HACCP o Hazard Analysis Critical Control Point è l'espressione di una filosofia di prevenzione igienica. L'ispezione microbiologica tradizionale richiede tempi lunghi, spesso non è sufficiente ad individuare le cause. Il concetto di HACCP conduce ad un approccio sistematico di valutazione del rischio nel processo produttivo. Il sistema HACCP aumenta l'efficienza del controllo della contaminazione microbica. L'estrapolazione del concetto di HACCP dall'industria alimentare al laboratorio di micropropagazione è l'obiettivo di questa indagine.

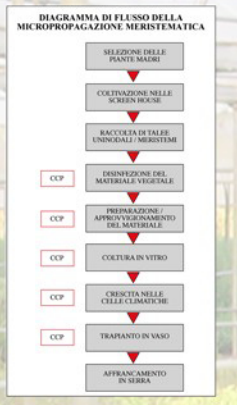
Lo sviluppo del piano HACCP prevede le seguenti fasi: FASI PRELIMINARI - FASE DI ANALISI DEL PIANO - FASE OPERATIVA

FASI PRELIMINARI

Descrizione gruppo di lavoro HACCP :

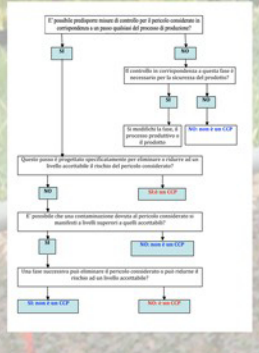
qualifica	interno all'azienda	esterno all'azienda
laureato	Responsabile laboratorio	
agronomo		Responsabile fitopatologo
tecnico	Responsabile screen house	
agronomo		Responsabile selezione piante (laboratorio di patologia vegetale)
laureato		Consulente HACCP

Definizione degli obiettivi del piano HACCP: identificare i rischi/pericoli che possono ragionevolmente verificarsi durante le fasi del processo di micropropagazione e applicare delle misure preventive e di controllo per gestire questi pericoli.
Descrizione dei prodotti finali:
piantine geneticamente e fenotipicamente uguali, nella stessa fase di crescita; esenti da malattie; affrancate.
La micropropagazione è una tecnica di produzione di massa di piantine che saranno uguali alla pianta madre.
Identificazione della destinazione d'uso: produzione florovivaistica, ricerca, biotecnologia.
Definizione del diagramma di flusso.



ALBERO DELLE DECISIONI

Analizzando i diagrammi di flusso, si controlla ogni fase utilizzando l'albero delle decisioni.Il percorso tecnico per mettere a punto il Piano di Autocontrollo Igienico, si basa sull'analisi del processo e sulle risposte sequenziali alle seguenti domande.



FASE DI ANALISI DEL PIANO: PRINCIPI HACCP

1. Identificazione dei pericoli
2. Identificazione dei punti critici di controllo (CCP) con albero delle decisioni
3. Limiti critici
4. Procedure di monitoraggio dei CCP
5. Azioni correttive
6. Procedure di verifica del sistema.

PRINCIPI 1-2 DELL'HACCP: IDENTIFICAZIONE DEI PERICOLI E PUNTI CRITICI DI CONTROLLO (CCP)
lo scopo è quello di identificare i punti critici di controllo CCP: punti, fasi o procedure in corrispondenza delle quali il controllo può essere applicato per prevenire, eliminare o ridurre a livelli accettabili il rischio di contaminazione.

Fase del processo	Quali pericoli in questa fase ci sono per lo stato fitosanitario delle piantine?	Che probabilità ha il pericolo di manifestarsi in questa fase? (Specificare le motivazioni)	Quali misure vengono prese per prevenire il pericolo?	La misure preventive adottate eliminano il pericolo o lo riducono ad un livello accettabile?	Una successiva tappa del processo riuscirà ad eliminare il pericolo o a ridurne la probabilità di comparsa? Se si, non è un CCP. Altrimenti tenere sotto controllo la tappa individuando uno o più CCP	CCP?
SELEZIONE DELLE PIANTE MADRI	Biologico: microrganismi patogeni virus funghi parassiti	Alto : diversi microrganismi e parassiti possono essere presenti	Selezione delle piante idonee con controllo visivo e ispezione fitosanitaria	Si	Si	
	Pianta non geneticamente adatta alla coltura in vitro	Alto :	Selezione dei fornitori	Si / No	Si	
COLTIVAZIONE NELLE SCREEN HOUSE	Biologico: microrganismi patogeni virus funghi parassiti	Alto :	Selezione per virus, batteri, funghi con test diagnostici per ogni pianta	Si	Si	
RACCOLTA DI TALEE UNINODALI / MERISTEMI	Biologico: microrganismi patogeni virus funghi parassiti		Scelta della stagione più adatta Formazione del personale	No	Si	
DISINFEZIONE DEL MATERIALE VEGETALE	Biologico: microrganismi patogeni funghi parassiti	Trascurabile: non si sono mai registrati ritrovamenti di corpi estranei	Scelta dei prodotti idonei (disinfettante) Procedura di lavorazione idonea Formazione del personale	Si	No	Si: selezione piante sane dalle contaminate nonostante la disinfezione
PREPARAZIONE / APPROVVIGIONAMENTO DEL MATERIALE STERILE	Biologico: microrganismi patogeni funghi parassiti	Alto :	Procedura di lavorazione idonea (GMP) Sterilizzazione materiale utilizzato per coltura in vitro Selezione fornitori di materiale sterile Sanificazione ambienti e attrezzature Formazione del personale	Si Si	No No	Si: monitoraggio ciclo di sterilizzazione in autoclave (tempo/temperatura)
COLTURA IN VITRO	Biologico: microrganismi patogeni virus funghi parassiti	Alto :	Procedura di lavorazione idonea (GMP) Formazione del personale Manutenzione attrezzature, Manutenzione cappe sterili Strutture idonee Sanificazione ambienti e attrezzature, cappe sterili. Pianificazione del flusso di lavorazione	Si Si	No No	Si: ispezione filtri Si: monitoraggio aria e superfici
	"deriva genetica"		Screening genetico	Si	No	Si: analisi impronta genetica "finger printing"
CRESCITA NELLE CELLE CLIMATICHE	Biologico: microrganismi patogeni virus funghi parassiti	Alto: contaminazione endogena Medio: contaminazione ambientale	Aggiunta di inibenti al terreno di coltura Aggiunta di inibenti Sanificazione piani di lavoro/ ambienti Disinfezione aria della cella Accesso limitato Formazione del personale	Si	No	
	Fisico: temperatura, umidità, illuminazione	Alto	Definizione delle condizioni ambientali	Si	No	Si: monitoraggio temperatura, umidità, illuminazione della cella
TRAPIANTO IN VASO	Biologico: microrganismi patogeni virus funghi parassiti	Medio	Trattamenti fitosanitari	Si	No	
	Fisiologico	Alto	Definizione delle condizioni ambientali Formazione del personale	Si	No	Si: monitoraggio temperatura e umidità della cella
AFFRANCAMENTO IN SERRA	Biologico: microrganismi patogeni virus funghi parassiti	Medio	Trattamenti fitosanitari	Si	No	
	Fisiologico	Alto	Definizione delle condizioni ambientali	Si	No	

FASE OPERATIVA: APPLICAZIONE DEL SISTEMA HACCP

Nella fase di applicazione del piano si attua praticamente quanto è stato deciso riguardo ala prevenzione dei rischi, monitoraggio e controllo dei CCP.
Operazioni per implementare il piano HACCP:
- formazione del personale in tema HACCP
- schede di controllo preoperative e operative.

PRINCIPI 3-4-5 DELL'HACCP: LIMITI CRITICI; MONITORAGGIO CCP; AZIONI CORRETTIVE

FASE	Monitoraggio	Frequenza	Metodo	Limiti critici	Trattamento / AC
DISINFEZIONE DEL MATERIALE VEGETALE	selezione piante sane dalle contaminate	Ad ogni inizio ciclo di coltura in vitro	Precoltivazione in vitro	Crescita di piante sane adatte alla moltiplicazione in vitro	Eliminazione dal ciclo delle piante non idonee Risefezione del materiale di partenza
PREPARAZIONE / APPROVVIGIONAMENTO DEL MATERIALE STERILE	ciclo di sterilizzazione in autoclave (tempo/temperatura)	Ad ogni ciclo	Registrazione del diagramma tempo/temperatura / impiego indicatore sterilizzazione	Parametri di sterilizzazione	Manutenzione attrezzatura Eliminazione / risterilizzazione del materiale
COLTURA IN VITRO	monitoraggio aria e superfici	Periodicità da definire	Campionamento microbiologico dell'aria e delle superfici	Standard interni da definire	Pulizia superfici Trattamento flussi d'aria Revisione GMP
	ispezione filtri	Periodicità definita dal costruttore	Verifica tecnica/ smontaggio filtri	Conformità dello stato dei filtri rispetto alle indicazioni del costruttore	Sostituzione filtri Pulizia cappa
	analisi impronta genetica "finger printing"	Random	PCR	Corrispondenza genetica delle piantine micropropagate rispetto alla pianta madre	Eliminazione delle piante non conformi
CRESCITA NELLE CELLE CLIMATICHE	monitoraggio temperatura e umidità della serra	Continua	Registrazione dei dati	Valori di crescita	Ripristino dei valori impostati Intervento tecnico di manutenzione
TRAPIANTO IN VASO	monitoraggio temperatura e umidità della serra	Continua	Registrazione dei dati	Valori di crescita	Ripristino dei valori impostati Intervento tecnico di manutenzione

CONCLUSIONI

La filosofia HACCP applicata al laboratorio di micropropagazione meristematica o al laboratorio di bioctenologie vegetali è efficace nel collocare i rischi ambientali delle diverse fasi del ciclo produttivo, catalogarli con una scala di valutazione del rischio, costruire una serie di misure di prevenzione.
Le risposte operative ai rischi andranno misurate nel tempo con opportuni strumenti di indagine microbiologica e strumentale, sulla falsariga di quanto è adottato dalle industrie agroalimentari.
La nostra indagine rimarca l'importanza della partecipazione e della formazione del personale dell'azienda.
L'autocontrollo è alla base della filosofia HACCP; questa forma di autodisciplina coinvolge tutti gli attori della produzione con l'obiettivo di ridurre i rischi, migliorare la qualità del prodotto finito, ridurre gli scarti, ottimizzare l'impiego delle risorse.

Le fotografie sono state gentilmente concesse da "Vivai Battistini" Via Pavennate, 1500 - 47020 Martorano di Cesena FC

ESTRA servizi grafici - 0331 849818 - info@estragrafica.it