



**INDICAZIONI PER IL PRELIEVO E L'INVIO DEI CAMPIONI DESTINATI
AD ANALISI MICROBIOLOGICHE: ALIMENTI, ACQUE E CAMPIONI DA SUPERFICI**

Scopo e campo di applicazione

Fornire indicazioni utili per i clienti che devono effettuare il campionamento di alimenti, acque e superfici da sottoporre ad analisi microbiologiche.

Attrezzature/strumenti/accessori

- Contenitori sterili (sacchetti, flaconi, bottiglie, contenitori in materiale plastico con tappo a tenuta con e senza tiosolfato, ecc.);
- Flambatore portatile;
- Guanti sterili; mascherina
- Strumenti sterili per eseguire il prelievo: forbici, pinze, bisturi, cucchiari, ecc.
- Tamponi sterili e spugnette per prelievi microbiologici con/o senza idoneo terreno di trasporto, delimitatori

REGOLE GENERALI PER IL CAMPIONAMENTO

In relazione all'esame richiesto e alla matrice, il campionamento deve essere effettuato in modo tale che il risultato analitico sia rappresentativo dello stato dell'intera partita o lotto oggetto del campionamento.

Devono essere adottate tutte le **norme igieniche necessarie** ad evitare l'inquinamento del campione nel corso delle operazioni di prelievo: utilizzo di pinze, forbici, cucchiari, coltelli sanificati o ancor meglio sterili, sacchetti sterili o contenitori abitualmente utilizzati per riporre/porzionare i cibi; impiego di guanti/mascherina. Il contenitore del campione non dovrebbe essere riempito per più di $\frac{3}{4}$ della sua capacità.

I campioni devono essere chiaramente ed univocamente identificati.

Confezionare/sigillare in modo adeguato il campione in modo evitare contaminazioni durante il trasporto.

I campioni devono pervenire al laboratorio unitamente ad un **documento di accompagnamento** (disponibile presso i laboratori o sul sito:

https://www.izsler.it/pls/izs_bs/v3_s2ew_consultazione.mostra_pagina?id_pagina=5333) o ad un verbale nel caso di campioni ufficiali, che riporti tutti i dati necessari all'accettazione, eventuale fatturazione, e alla emissione del Rapporto di Prova).

MODALITA' DI TRASPORTO

Il Cliente è responsabile delle fasi di campionamento e trasporto.

Il mantenimento della catena del freddo (la temperatura di trasporto generalmente richiesta è : $+1^{\circ}\text{C} \div +8^{\circ}\text{C}$) attraverso modalità di trasporto del campione adeguate, è fondamentale per evitare l'alterazione delle caratteristiche microbiologiche del prodotto campionato.

Al fine di poter verificare al momento della consegna del campione la temperatura di trasporto è opportuno che il Cliente provveda a dotarsi di un contenitore contenente glicerolo o acqua (campione sentinella o testimone) che sarà trasportato alle stesse condizioni di temperatura dei campioni e che consentirà il rilievo della Temperatura. La temperatura di trasporto deve essere compresa tra : $+1^{\circ}\text{C} \div +8^{\circ}\text{C}$.

Il contenitore con il glicerolo è fornito gratuitamente dal laboratorio.

L'impossibilità del controllo della temperatura di trasporto sarà indicata nel Rapporto di Prova.

CAMPIONAMENTO DI ALIMENTI

Per matrici che si presentano allo stato sfuso, è importante che l'aliquota da prelevare sia rappresentativa del campione in toto:

- Per campioni liquidi: mescolare prima del prelievo.
- Per campioni solidi di piccole dimensioni: prelevare unità intere o più campioni in punti diversi.
- Per campioni solidi di grosse dimensioni: con attrezzature da taglio adeguate, prelevare in punti diversi del campione stesso dalla superficie alla profondità.

Il quantitativo da prelevare deve corrispondere ad un minimo di circa 150 - 200 g/mL.

CAMPIONAMENTO DI SUPERFICI

Possono essere eseguiti i seguenti prelievi:

- tamponi e spugnette da attrezzature e superfici di lavoro per valutare l'efficacia delle procedure di lavaggio e disinfezione degli ambienti, attrezzature o tutto ciò che possa venire a contatto con gli alimenti nelle fasi di produzione, distribuzione e manipolazione, e di stimare la possibilità e l'entità delle contaminazioni degli alimenti che possono derivare dal contatto con queste superfici.

È importante che sulle superfici campionate non siano presenti **residui di disinfettanti**.



**INDICAZIONI PER IL PRELIEVO E L'INVIO DEI CAMPIONI DESTINATI
AD ANALISI MICROBIOLOGICHE: ALIMENTI, ACQUE E CAMPIONI DA SUPERFICI**

- tamponi e spugnette da carcasse (metodo non distruttivo/metodo non distruttivo, Reg. (CE) 2073/2005 e s.m.i.) per verificare le condizioni igieniche durante la macellazione.

Se su una stessa superficie si vogliono controllare diversi parametri quantitativi (es. Carica Batterica/Enterobatteri) e quantitativi (es. Salmonella/Listeria m.) è necessario effettuare, da aree attigue, un prelievo per ogni determinazione qualitativa (presenza/assenza), mentre sarà sufficiente un solo prelievo per effettuare più determinazioni quantitative.

Nel documento di accompagnamento, oltre alle informazioni generali, indicare anche:

- punto di prelievo,
- dimensione dell'area campionata in cm² (superficie totale se carcasse)
- il volume ed il tipo di diluente utilizzato
- indicazione della specie animale (campionamento carcassa)

PRELIEVO CON TAMPONE

- Identificare i siti di campionamento e delimitare l'area da sottoporre a prelievo.
- Inumidire il tampone nel diluente sterile o fluido neutralizzante, se opportuno. Assicurarsi che il tampone sia adeguatamente imbevuto, premere la punta del tampone contro la parete della provetta per eliminare l'eccesso di liquido.

L'area compresa nel perimetro interno del delimitatore non deve venire a contatto con le mani dell'operatore né con alcun altro materiale diverso dal tampone per campionamento.

Strisciare il tampone su tutta l'area oggetto di prelievo esercitando una buona pressione e avendo cura di ruotare il tampone in modo che tutta la superficie del tampone stesso entri in contatto con la superficie da campionare. Il tampone dovrebbe essere strisciato sulla superficie da campionare orizzontalmente, verticalmente e in diagonale (circa 10 volte in ciascun senso). Il tampone non deve essere strofinato al di fuori dell'area delimitata. Riporre quindi il tampone nella provetta contenente il diluente sterile, spezzando l'asta contro la parete del contenitore

- Completate le attività di campionamento, riporre i tamponi nelle rispettive provette in un sacchetto di plastica sul quale sia stata apposta una etichetta identificativa del campione.

PRELIEVO CON SPUGNA /GARZA

- Identificare i siti di campionamento, delimitare l'area da sottoporre a prelievo.
L'area compresa nel perimetro interno del delimitatore non deve venire a contatto con le mani dell'operatore né con alcun altro materiale diverso dalla spugna per campionamento.
- Preparare le spugnette aggiungendo nel sacchetto plastico tipo stomacher una quantità di diluente sterile sufficiente a inumidire la spugna senza che rimanga del liquido libero visibile al fondo del sacchetto (in genere 10 ml) e massaggiare la spugna dall'esterno per essere certi che la stessa sia uniformemente inumidita. In commercio sono disponibili spugnette già inumidite, pronte all'uso.
- Estrarre la spugna dal sacchetto e strofinarla, esercitando una buona pressione, sull'area delimitata dalla maschera sia in senso orizzontale che verticale (circa 10 volte in un senso e 10 nell'altro). L'intera superficie racchiusa all'interno del delimitatore deve essere interessata dal campionamento. La spugna non deve essere strofinata al di fuori dell'area delimitata.
- Riporre la spugna nella busta di plastica, sigillare il sacchetto e predisporre per l'invio al laboratorio dopo avere verificato la corretta identificazione del campione.

NOTA:

Se si richiedono più determinazioni su una stessa superficie (es. analisi qualitative come ricerca di Salmonella spp. e Listeria monocytogenes; e analisi quantitative ad es. numerazione microrganismi, E. coli, ecc): è necessario conferire al laboratorio una spugna per le analisi quantitative cui associare eventualmente la sola ricerca di Salmonella spp ed eventualmente una spugna dedicata alla ricerca di patogeni diversi da Salmonella, es. Listeria monocytogenes.



**INDICAZIONI PER IL PRELIEVO E L'INVIO DEI CAMPIONI DESTINATI
AD ANALISI MICROBIOLOGICHE: ALIMENTI, ACQUE E CAMPIONI DA SUPERFICI**

PRELIEVO CON PIASTRE A CONTATTO O DIPLSLIDE

Il metodo è applicabile solo alle superfici piane e perfettamente asciutte.

Individuare la superficie da campionare, togliere il coperchio e porre la piastra in modo che il terreno agarizzato aderisca alla superficie, esercitare una pressione uniforme pari a 500 grammi sulla piastra senza produrre alcun movimento laterale.

Chiudere immediatamente le piastre o i diplslides dopo l'inoculo e riporle nel contenitore di trasporto.

CAMPIONAMENTO DI CARCASSE

I siti nei quali sono prelevati i campioni sono scelti tenendo conto della tecnica di macellazione utilizzata in ciascun impianto.

Quando si procede al campionamento per la ricerca delle Enterobacteriaceae e per la numerazione dei microrganismi aerobi, i prelievi sono effettuati in quattro siti di ogni carcassa.

Sono previsti differenti metodi di campionamento: si prelevano con metodo distruttivo quattro campioni di tessuto che costituiscono un totale di 20 cm², nel caso si ricorra al metodo non distruttivo, l'area campione è di almeno 100 cm² (50 cm² per i piccoli ruminanti) per sito di campionamento.

Quando si prelevano campioni per la ricerca di Salmonella, viene utilizzato un metodo di prelievo con spugna abrasiva; l'area campione è di almeno 100 cm² per sito selezionato.

Quando i campioni vengono prelevati da diversi siti sulle carcasse, prima di essere esaminati vengono aggregati.

Prelievo con metodo non distruttivo

Si prelevano con metodo non distruttivo quattro campioni in siti definiti, l'area campione è di almeno 100 cm² (50 cm² per i piccoli ruminanti) per sito di campionamento.

Per ciascun sito da campionare procedere nel seguente modo:

- rimuovere il tampone dal suo contenitore e inumidirlo nella provetta contenente soluzione salina peptonata;
- premere la punta del tampone contro la parete della provetta per eliminare l'eccesso di liquido.
- porre la punta del tampone sulla superficie da campionare e strofinare un'area stimata di 100 cm², in due direzioni, ad angolo retto l'una rispetto all'altra, facendo ruotare contemporaneamente il tampone.
- porre il tampone nel sacchetto sterile e asetticamente spezzare l'asta.
- ripetere l'operazione del campionamento sullo stesso punto, utilizzando un tampone asciutto; riporre dopo l'operazione anche il secondo tampone nel medesimo sacchetto.
- procedere analogamente per gli altri 3 punti, riponendo tutti i tamponi nello stesso sacchetto.

Prelievo con metodo distruttivo

Quando si ricorre al metodo distruttivo si prelevano con quattro campioni di tessuto che costituiscono complessivamente un totale di 20 cm², i 4 siti di campionamento sono ciascuno di 5 cm².

Per ciascun sito da campionare procedere nel seguente modo:

- rimuovere da ciascun sito individuato uno strato di cute/tessuto di circa 2mm di spessore e di 5 cm² utilizzando una lama/bisturi sterile.
- Riporre i lembi prelevati nei 4 siti in un sacchetto sterile.

Nel caso di prelievo di cute da carcasse di pollame seguire le indicazioni del Reg. (CE) 2073.

Prelievo con spugna

N.B. in genere i kit per il campionamento di questo tipo comprendono tutto il necessario.

Una volta individuati i siti di campionamento procedere come segue:

- Nel caso di KIT: aprire il sacchetto contenente la spugna sterile e aggiungere 10 ml di soluzione peptonata salina;
- Strofinare la spugna per 10 volte in direzione verticale e dieci 10 volte in direzione orizzontale sul sito di 100 cm² individuato.
- Procedere analogamente per gli altri punti, riporre la spugna nel sacchetto.

Il numero di carcasse da campionare per ogni seduta di campionamento è stabilito dalle normative vigenti

NB: Per quanto riguarda i tamponi sia ambientali che su carcassa, si evidenzia che **NON** sarà più possibile conferire tamponi privi di liquido di trasporto o con terreno di trasporto solido.



CAMPIONAMENTO DI ACQUE (POTABILITÀ)

- Utilizzare appositi flaconi di plastica sterili con tappi a tenuta
- Per indicatori microbiologici sono sufficienti 500 mL di acqua
- Per ricerca Legionella o altri patogeni prelevare almeno 1L di acqua
- Per acque trattate con ozono cloro o i suoi derivati utilizzare appositi flaconi sterili contenenti tiosolfato di sodio (18-20 mg/L)
- Non sciacquare le bottiglie e i contenitori utilizzati per prelevare campioni all'atto del prelievo
- Disinfettare il rubinetto prima del campionamento, eccetto i casi in cui è necessario ottenere campioni per indagini epidemiologiche e che comunque debbono fornire altri tipi di informazioni
- Pulire il rubinetto esternamente ed internamente rimuovendo, se presenti, tubi e guarnizioni di gomma e plastica utilizzando in base alla necessità:
 - Disinfettanti per es. alcool o soluzioni di sodio ipoclorito commerciale che visto l'effetto corrosivo andranno impiegate con le opportune cautele da parte degli operatori
 - Sostanze sgrassanti per la rimozione di eventuali film di grasso
 - Lasciare agire il disinfettante per 1 – 2 minuti
 - È possibile ricorrere all'operazione di flambaggio del rubinetto (solo rubinetti metallici), solo come attività supplementare alla pulizia e disinfezione comunque obbligatoria
- Aprire il rubinetto e fare scorrere l'acqua per un tempo sufficiente per far sì che i disinfettanti vengano eliminati
- Eseguire il prelievo dopo aver fatto scorrere dal rubinetto l'acqua per 1 – 3 minuti evitando di modificare la portata del flusso durante la raccolta del campione
- All'atto del prelievo aprire il flacone sterile avendo cura di non toccare la parte interna del tappo che andrà in contatto con il campione prelevato, né l'interno del collo del flacone
- Provvedere all'immediata chiusura del flacone subito dopo il prelievo avendo cura di non riempirlo completamente al fine di consentire una efficace omogeneizzazione del campione, in laboratorio, al momento dell'analisi.
- Nel documento di accompagnamento, oltre alle informazioni generali, indicare anche:
 - data e ora del prelievo,
 - tipo di acqua
 - punto di prelievo
- Conferire il campione al laboratorio entro 24 ore dal prelievo.

Si raccomanda di mantenere la temperatura di trasporto e conservazione dei campioni di acqua nell'intervallo consigliato e di verificare che la temperatura di conservazione del campione non superi mai quella di prelievo.

Documenti di riferimento

Generali

- ISO 7218 "Microbiology of food and animal feeding stuff – General requirement and guidance for microbiological examination"

Alimenti

- Buone pratiche di esecuzione del campione – Quaderni InforMo Azienda Usl Modena 2004

Campioni da superfici e carcasse

- ISO 17604 Microbiological of food and animal feeding stuffs – Carcass sampling for microbiological analysis
- ISO 18593 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs

Acque

- UNI EN ISO 19458 2006 Qualità dell'acqua: campionamento per analisi microbiologiche
- APAT CNR IRSA 6010 Man 29 2003