

Titolo della procedura: *Campionamento e trasporto dei campioni ALIMENTI*

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente procedura fornisce le informazioni necessarie per la corretta attività di campionamento e per le modalità più idonee alla loro conservazione durante il trasferimento al Laboratorio da parte del Personale qualificato INSES o del Cliente, qualora si occupi direttamente dell'esecuzione del campionamento.

Si applica al campionamento di alimenti, acque (in particolare quelle destinate al consumo umano), tamponi/spugne e piastre a contatto.

2. NORMATIVA DI RIFERIMENTO

- ISO 7218:2024 “Microbiology of the food chain- General requirements and guidance and guidance for microbiological examinations”
- Regolamento (CE) n. 2073/2005 Della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari
- Regolamento CE) N. 1441/2007 Della Commissione del 5 dicembre 2007 che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari
- Regolamento (CE) N. 1168/2006 Della Commissione del 31 luglio 2006 che applica il regolamento (CE) n. 2160/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda un obiettivo comunitario per la riduzione della prevalenza di determinati sierotipi di salmonella nelle ovaiole di Gallus gallus e modifica il regolamento (CE) n. 1003/2005
- UNI EN ISO 17604:2015 “Campionamento delle carcasse per analisi microbiologica”
- UNI EN ISO 6887-3 “Microbiologia della catena alimentare – preparazione dei campioni di analisi, sospensione iniziale e diluizioni decimali per l'analisi microbiologica- Part 3: regole specifiche per la preparazione del pesce e prodotti della pesca.”

3. CAMPIONAMENTO DI PRODOTTI ALIMENTARI PER ANALISI MICROBIOLOGICHE

Il concetto fondamentale del campionamento microbiologico è che il campione deve arrivare al Laboratorio nelle stesse condizioni microbiologiche in cui si trova al momento del prelievo e i requisiti essenziali per cui questo possa avvenire sono:

- Prelievo eseguito in sterilità
- Corretto trasporto al Laboratorio

3.1 Formazione del campione, modalità di frazionamento

Gli strumenti impiegati per la formazione del campione devono essere sterili:

- Materiale sterile monouso (sacchetti, barattoli, ecc.)
- Materiale metallico (cucchiai, pinze, coltelli, ecc.) pulito e sterilizzato alla fiamma (flambatura)

In caso di accesso ad aree di produzione, munirsi di camici e cappellini monouso e di sovrascarpe (ove necessari)

Durante i prelievi munirsi di guanti monouso. Ricordarsi inoltre di non toccare mai direttamente con le mani l'interno dei contenitori sterili o i campioni da prelevare.

Le quantità di campione necessarie per l'indagine microbiologica sono le seguenti:

PARAMETRO RICERCATO	QUANTITA' MINIMA DI CAMPIONE
Salmonella	100 g/ml

Titolo della procedura: *Campionamento e trasporto dei campioni ALIMENTI*

Listeria	100 g/ml
Campylobacter	100 g/ml
Yersinia enterocolitica	100 g/ml
E. coli O157:H7	100 g/ml
Altri parametri microbiologici	100 g/ml

Per l'analisi di più parametri simultaneamente devono essere sommate le quantità indicate per ogni singola categoria.

Al momento del prelievo del campione ricordarsi sempre di prelevare una quantità di campione sufficiente sia per l'analisi sia per la conservazione di un'aliquota campionaria per eventuali ripetizioni o approfondimenti analitici.

Una volta prelevato il campione porlo velocemente nel contenitore sterile e chiuderlo immediatamente.

3.1.1 Prodotti confezionati

Quando è possibile prelevare confezioni originali, integre e ancora sigillate. In questo caso non si esegue nessun tipo di frazionamento. Se è necessario aprire una confezione per eseguire il prelievo, disinettare con alcool la superficie esterna e lasciar evaporare apprendo poi il campione con strumenti sterili diversi da quelli usati per il prelievo.

3.1.2 Prodotti non confezionati

Per i prodotti liquidi o altamente viscosi procedere prima del prelievo ad un accurato mescolamento della massa per renderla il più possibile omogenea e quindi prelevare un campione sufficientemente rappresentativo.

Per i prodotti solidi, in polvere o in granuli si effettuano più prelievi in punti diversi della massa campione in modo da ottenere un campione sufficientemente rappresentativo e ridurre il più possibile eventuali errori legati alla posizione del prelievo.

3.1.3 Identificazione del campione

Il campione prelevato deve essere accompagnato da tutte le indicazioni necessarie alla sua identificazione:

1. data del campionamento
2. tipo di matrice
3. lotto e/o data di produzione e/o data di scadenza
4. produttore e/o denominazione di vendita.

e qualunque altra informazione possa risultare utile per la rintracciabilità del campione.

3.2 Trasporto del campione

Il campione deve essere trasportato ponendo attenzione che il contenitore non venga danneggiato, rotto o forato e deve giungere al Laboratorio nel minor tempo possibile (entro al massimo 24 ore dal prelievo), senza mai interrompere la catena del freddo e rispettando le seguenti temperature di trasporto:

TEMPERATURE DI TRASPORTO	
Prodotti stabili a temperatura ambiente	18-27°C

Titolo della procedura: *Campionamento e trasporto dei campioni ALIMENTI*

Prodotti surgelati o congelati	<-18°C
Prodotti refrigerati (non stabili a temperatura ambiente)	5°C ± 3°C
Prodotti della pesca (ISO 6887-3:2017)	0-10°C

I campioni refrigerati e surgelati/congelati devono essere trasportati con frigobox muniti di piastre eutettiche e termometro di min-max (oppure un data logger) per verificare il mantenimento della temperatura durante il trasporto. La registrazione della temperatura di trasporto (ad opera del personale Inses) viene riportata nel Mod. 49 durante la fase di campionamento.

3.3 Accettazione del campione

In fase di accettazione del campione ACC controlla la temperatura mediante l'utilizzo di un termometro a raggi infrarossi (pirometro).

Il Laboratorio reputa conformi i seguenti range di temperatura in fase di accettazione:

TEMPERATURE DI ACCETTAZIONE	
Prodotti stabili a temperatura ambiente	18-27°C
Prodotti surgelati o congelati	<-15°C*
	<i>* Qualora il campione venga trasportato refrigerato si accetta come conforme il range 5°C ± 3°C purché il campione venga immediatamente analizzato, in quanto il tempo trascorso tra prelievo e consegna è ritenuto come parte del tempo di scongelamento.</i>
Prodotti refrigerati (non stabili a temperatura ambiente)	5°C ± 3°C
Prodotti della pesca (ISO 6887-3:2017)	0-10°C

3.4 Conservazione del campione prima dell'analisi

Il campione viene sottoposto ad analisi nel minor tempo possibile dal momento del ricevimento, preferibilmente entro 24 ore. Qualora l'analisi non venga effettuata immediatamente il campione viene conservato alle seguenti temperature:

TEMPERATURE DI CONSERVAZIONE	
Prodotti stabili a temperatura ambiente	18-27°C
Prodotti surgelati o congelati	<-18°C
Prodotti refrigerati (non stabili a temperatura ambiente)	5°C ± 3°C

Titolo della procedura: *Campionamento e trasporto dei campioni ALIMENTI*

Prodotti della pesca (ISO 6887-3:2017)

0-10°C

quanto riportato sopra per le acque destinate al consumo umano, sia per analisi l'microbiologica che chimica. L'intervallo di temperatura di accettazione del campione all'arrivo in laboratorio è compreso tra 4-10°C.

4. CAMPIONI DI SUPERFICIE

4.1 Contact slides

La superficie campionata è pari a 10 cm². Il terreno agarizzato forma un menisco convesso con la superficie della piastra e può essere di diverso tipo a seconda del microrganismo che si vuole ricercare.

4.1.1 Esecuzione

- Svitare il tappo contenente la slide con i due terreni di coltura; evitare qualsiasi contatto con le superfici dell'agar;
- piegare il tappo fino a formare un angolo di 90° e poggiare la slide sulla superficie da esaminare esercitando una leggera pressione per almeno 10 secondi; procedere allo stesso modo per l'altra faccia della slide;
- riavvitare la slide nel suo bicchiere e porlo nel contenitore di trasporto.

4.2 Piastre a contatto

Si impiegano piastre di 24 cm² di diametro in accordo con il tipo di superficie da campionare. L'agar forma un menisco convesso con la superficie della piastra e può essere di diverso tipo a seconda del microrganismo che si vuole ricercare.

4.2.1 Esecuzione

- Togliere il coperchio e premere la superficie dell'agar fermamente e senza movimenti laterali sulla superficie da campionare;
- Esercitare una pressione per almeno 10 secondi;
- Chiudere la piastra immediatamente dopo l'inoculo e porla nel contenitore di trasporto.

4.3 Tamponi a striscio

Trattasi di bastoncini con la punta ricoperta di cotone o materiale sintetico contenuti in provette o contenitori sterili provvisti o meno di soluzione eluente.

4.3.1 Esecuzione su superfici (ISO 18593)

- Aprire la confezione sterile ed estrarre il tampone per il prelievo;
- Se provvisto di soluzione eluente, inumidire il tampone con la soluzione, quindi rimuovere il liquido in eccesso comprimendolo sulla parete del contenitore;
- Utilizzando la mascherina sterile in dotazione oppure quella metallica opportunamente pulita, disinfeccata e flambata di 100 cm² delimitare la superficie da campionare;
- Strisciare il tampone sulla superficie delimitata dalla maschera sterile roteando il bastoncino tra le dita secondo le due direzioni perpendicolari;
- Immergere il tampone nella provetta contenente la soluzione eluente di liquido isotonicco;

Titolo della procedura: *Campionamento e trasporto dei campioni ALIMENTI*

- Richiudere la provetta e porla immediatamente nel contenitore di trasporto;
- Se il prelievo viene fatto su superfici dove non è possibile usare la mascherina sterile il risultato verrà espresso sul rapporto di prova non come UFC/cm² ma come UFC/superficie tamponata.
- Se il tamponcino viene utilizzato per dimostrare la presenza/assenza di specifici microrganismi (ad esempio *Listeria monocytogenes* o *Salmonella* spp.) l'area esaminata deve essere almeno di 100 cm² e preferibilmente circa 1.000 cm²

4.3.2 Esecuzione su carcasse (ISO 17604)

- Aprire la confezione sterile ed estrarre il tamponcino per il prelievo;
- Bagnare il tamponcino in 10 ml di diluente (acqua peptonata/peptonata tamponata);
- Utilizzando la mascherina sterile in dotazione oppure quella metallica opportunamente pulita, disinfeccata e flambata di 100 cm² delimitare la superficie da campionare;
- Strofinare premendo il tamponcino sull'intera superficie spostandosi in orizzontale e in verticale, per almeno dieci volte in ogni direzione;
- Inserire il tamponcino nella provetta con il diluente utilizzato per bagnarla, spezzando l'asta di plastica all'interno della provetta;
- Con un tamponcino asciutto, sottoporre a campionamento di nuovo la stessa superficie, utilizzando la stessa tecnica per assorbire l'eventuale liquido rimasto dal tamponcino bagnato come sopra, e posizionare questo tamponcino nella stessa provetta;

4.4 Metodo della spugna

Per campionare aree di grandi dimensioni si utilizza una spugna (sponge bag) che diversamente dai tamponi a bastoncino, queste possono essere strofinite più vigorosamente sopra le superfici e sono altamente assorbenti. La spugna dovrebbe essere inumidita con una quantità sufficiente di diluente; nel caso in cui l'area da campionare sia bagnata si può utilizzare una spugna asciutta.

4.4.1 Esecuzione su superfici (ISO 18593)

- Aprire il sacchetto di plastica sterile ed estrarre la spugna;
- Campionare la superficie orizzontalmente e verticalmente utilizzando una pressione uniforme, cambiando la faccia della spugna e assicurandosi che l'intera area sia campionata;
- Rimettere la spugna nel sacchetto e accertarsi che rimanga umida sino al momento dell'analisi;
- Chiudere il sacchetto e porlo immediatamente nel contenitore di trasporto;
- Se il prelievo viene fatto su superfici dove non è nota la grandezza della superficie il risultato verrà espresso sul rapporto di prova non come UFC/cm² ma come UFC/superficie tamponata;
- Se la spugna viene utilizzata per dimostrare la rilevabilità/non rilevabilità di specifici microrganismi (ad esempio *Listeria monocytogenes* o *Salmonella* spp.) l'area esaminata deve essere almeno di 100 cm² e preferibilmente circa 1.000 cm²

4.4.2 Esecuzione su carcasse (ISO 17604)

- Aprire il sacchetto di plastica contenente la spugna sterile e aggiungere 10 ml di diluente per bagnarla e non lasciare liquido in eccesso massaggiare la spugna dall'esterno del sacchetto per bagnarla completamente;
- Utilizzando la mascherina sterile in dotazione oppure quella metallica opportunamente pulita, disinfeccata e flambata di 100 cm² delimitare la superficie da campionare;

Titolo della procedura: *Campionamento e trasporto dei campioni ALIMENTI*

- Posizionare il delimitatore sulla superficie di prova, utilizzare il sacchetto come un guanto rovesciandolo e afferrare la spugna per strofinarla sulla superficie di prova;
- Strofinare premendo la spugna sull'intera superficie spostandosi in orizzontale e in verticale, per almeno dieci volte in ogni direzione;
- Dopo il prelievo riporre la spugna nel suo sacchetto di plastica e all'arrivo in laboratorio aggiungere il resto del diluente
- Se la spugna viene utilizzata per dimostrare la rilevabilità/non rilevabilità di specifici microrganismi (ad esempio *Salmonella* spp.) l'area campione totale deve essere di almeno 400 cm²

I siti di campionamento da scegliere dipendono dalle diverse specie di animali. Per i dettagli si rimanda al prospetto A.1 della norma di riferimento (ISO 17604).

4.5 Identificazione del tampone/piastra

Riportare sui singoli tamponi e su il verbale di campionamento e accettazione (Mod. 49), le seguenti informazioni:

1. data del prelievo
2. tipo di superficie oggetto del tampone/piastra
3. nel caso di tamponi a striscio se è stata impiegata o meno la mascherina sterile.

4.6 Modalità di trasporto

Tamponi, spugne e piastre di contatto devono essere trasportati al Laboratorio nel minor tempo possibile (entro 24 ore dal campionamento) mediante frigo box a temperatura di 1-8°C.

Utilizzare un termometro di min-max (oppure un data logger) per la verifica del mantenimento della temperatura durante il trasporto. La registrazione della temperatura di trasporto viene riportata nel mod. 49 durante la fase di campionamento.

Assicurarsi che non si verifichino contaminazioni durante il trasporto.

4.7 Fase di accettazione

In fase di accettazione del campione ACC controlla la temperatura mediante l'utilizzo di un termometro a raggi infrarossi (pirometro).

Il range di temperatura accettabile è di 1-8°C.

4.8 Conservazione prima dell'analisi

Il Laboratorio analizza i campioni nel minor tempo possibile dal momento del ricevimento, possibilmente entro 24 ore dal campionamento. Se l'analisi non viene eseguita subito dopo ricezione, i campioni vengono conservati alla temperatura di 3°C ± 2°C per un massimo di 48 ore dal campionamento per tamponi/spugne su superfici o di 24 ore dal campionamento per tamponi/spugne su carcasse.

5. CAMPIONAMENTO CARCASSE DI POLLAME

Il campionamento delle carcasse di pollame è effettuato nei macelli, in cui vengono prelevati campioni da carcasse intere di pollame con pelle di collo per la ricerca di *Salmonella* e *Campylobacter*.

Secondo il Regolamento UE 1495/2017, i controlli nei macelli effettuati per verificare la conformità ai criteri di igiene del processo, relativamente a *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. presenti in carcasse di pollame e se le prove per tali microrganismi sono condotte dallo stesso laboratorio sono prelevati casualmente, in ogni sessione di campionamento, campioni di pelle di collo da almeno 15 carcasse dopo raffreddamento.

Titolo della procedura: *Campionamento e trasporto dei campioni ALIMENTI*

Prima di essere esaminati, i campioni di pelle di collo prelevati da almeno tre carcasse di pollame provenienti dallo stesso branco di origine sono aggregati in un unico campione di 25 g. I campioni di pelle di collo formano 5 campioni finali di 25 g, che sono necessari per la ricerca di *Salmonella* e *Campylobacter* in parallelo da un campione.

Allo scopo di garantirne l'integrità, dopo il prelievo i campioni sono conservati e trasportati al laboratorio a una temperatura non inferiore a 1°C e non superiore a 8°C e il tempo tra il campionamento e le prove per il *Campylobacter* è inferiore a 48 ore. I campioni che sono scesi a una temperatura di 0°C non sono usati per controllare la conformità al criterio relativo al *Campylobacter*.

Per la ricerca di *Salmonella* nella carne fresca di pollame diversa dalle carcasse di pollame vengono prelevati cinque campioni di almeno 25 g dalla stessa partita. Il campione prelevato da parti di pollame con pelle contiene pelle e una sottile porzione di muscolo superficiale se la quantità di pelle non fosse sufficiente a formare un'unità campionaria. Il campione prelevato da parti di pollame senza pelle o con ridotta quantità di pelle contiene una sottile porzione di muscolo superficiale o porzioni di muscolo aggiunte alla pelle presente in modo da formare un'unità campionaria adeguata. Le porzioni di carne sono prelevate in modo da racchiudere la più vasta superficie di carne possibile.

6. INFORMAZIONI ULTERIORI PER I CLIENTI

Il personale del Laboratorio, su richiesta, fornisce il materiale necessario per il campionamento ed è a disposizione per qualsiasi informazione a riguardo.

Per parametri analitici non considerati nella presente procedura, chiamare sempre il Laboratorio ed accertarsi delle modalità di campionamento e della quantità di campione da prelevare.