



a cura di
Monica Paolini
Morena Piumi
Roberto Seghedoni

BUONE PRATICHE DI ESECUZIONE DEL CAMPIONE

tratte dalla lezione tenuta dal

dr. Stefano Bassi

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Sezione di
Modena

in occasione del corso:

**TECNICHE E METODICHE
DI CAMPIONAMENTO NELL'INDUSTRIA
AGROALIMENTARE**



SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA-ROMAGNA
Azienda Unità Sanitaria Locale di Modena

Dipartimento di Sanità Pubblica
Informo

BUONE PRATICHE DI ESECUZIONE DEL CAMPIONE

tratte dalla lezione tenuta dal

dr. Stefano Bassi

(Istituto Zooprofilattico Sperimentale - Sezione di Modena)

in occasione del corso

“Tecniche e metodiche di campionamento nell’industria agroalimentare”

a cura di M. Paolini, M. Piumi e R. Seghedoni

Castelnuovo R. 17.03.2004

Le immagini sono gentilmente concesse dalla “International Ipi” di Milano

CONSIDERAZIONI SUL CAMPIONAMENTO

L'esperienza dimostra che gli errori commessi durante il campionamento sono frequenti, uno dei motivi per cui ciò accade è perché le operazioni sono sì molto semplici ma non necessariamente sono di facile esecuzione.

Il campionamento è determinante ai fini di un corretto risultato analitico e la precisione dell'analisi può essere vanificata se il prelievo della matrice non è stato eseguito correttamente. Secondo alcuni ricercatori l'incertezza prodotta dal campionamento costituisce, da sola, un terzo dell'incertezza totale del risultato di analisi, quindi **potremmo paradossalmente affermare che il prelievo è più importante dell'analisi.**

RIFERIMENTI NORMATIVI

La legislazione "storica" nazionale riguardante il controllo degli alimenti non dà, in genere, indicazioni sulle modalità operative da seguire per il campionamento microbiologico.

La normativa in cui viene data maggiore importanza a questo aspetto e in cui vengono riportate precise modalità di prelievo alle quali attenersi, è quella recente:

- Decisione 471/2001 CE riguardante i controlli generali delle condizioni igieniche di produzione delle carni fresche,
- Circolare Min San del 28/08/2002 riguardante la ricerca di *L.monocytogenes* in prosciutti crudi stagionati.
- Guidelines for Escherichia coli testing for Process Control Verification in Cattle and Swine Slaughter Establishments". Esempio di linee guida, redatte dall'USDA nel 1997, che vengono applicate anche in Italia nei macelli per suini abilitati all'esportazione verso gli USA e che riportano una ben definita metodica di prelievo da superfici di carcasse suine e bovine.

Esistono anche dei documenti prodotti da Organismi Internazionali (ad. es. ISO, IDF, ecc.) che riportano dettagliate metodiche di campionamento per alcune tipologie di alimenti e per i campioni ambientali.

E' consigliabile comunque definire le procedure da seguire partendo dalla propria "realtà" e dalle proprie esigenze ricavando magari dalle procedure suddette soltanto i principi essenziali e i criteri generali.

ARGOMENTI TRATTATI

Campionamento di alimenti per esami microbiologici

Campionamento di superfici per esami microbiologici

CAMPIONAMENTO MICROBIOLOGICO

Concetto fondamentale del campionamento microbiologico:

il campione deve arrivare al laboratorio nelle stesse condizioni microbiologiche in cui si trova al momento del prelievo e i requisiti essenziali perché questo possa avvenire sono:

- prelievo eseguito in sterilità
- corretto trasporto al laboratorio

CAMPIONAMENTO MICROBIOLOGICO DI ALIMENTI

Matrici campionabili:

- Materie prime
- Semilavorati
- Prodotti finiti

Materiale necessario:

- Termometro
- Strumenti necessari per formare il campione
- Contenitori per il campione
- Verbale o Documento di Accompagnamento (D.A.)
- Contenitori per il trasporto al laboratorio
- Abbigliamento monouso: guanti, soprascarpe, camici, copricapo, mascherina, ecc

Fasi "operative":

- Definizione di un piano di campionamento
- Formazione del campione
- Confezionamento
- Compilazione del Verbale o D.A.
- Trasporto al laboratorio

1. DEFINIZIONE DI UN PIANO DI CAMPIONAMENTO.

La scelta del campione deve basarsi, quando ciò sia ragionevole, su metodi statistico-matematici volti a definire quantitativamente il numero di unità campionarie necessario e sufficiente per ottenere dall'analisi di queste dei risultati rappresentativi estendibili all'intera partita o lotto da esaminare. Il campione deve quindi essere rappresentativo, per quanto possibile, della totalità.

2. FORMAZIONE DEL CAMPIONE

- a. Modalità di frazionamento
- b. Quantità di materiale da prelevare
- c. Numero di aliquote o di unità campionarie (U.C.)

2.a. modalità di frazionamento

Gli strumenti impiegati per la formazione del campione devono essere sterili

- Materiale sterile monouso
- Materiale sterilizzabile con i seguenti metodi:
 - Stufa a secco (calore secco) a 160° - 170° per 2 ore
 - Autoclave (calore umido) a 121° per 15 minuti
 - Sterilizzazione alla fiamma (flambatura) per materiali metallici
 - Immersione in alcool e successiva flambatura
 - Immersione in acqua bollente per almeno 10 minuti (per bottiglie in vetro)

Prodotti confezionati

- Quando è possibile prelevare confezioni originali, integre e ancora sigillate. In questo caso non si esegue nessun tipo di frazionamento.
- Quando è necessario aprire una confezione per eseguire il prelievo, disinfettare con alcool 70° la superficie esterna e lasciar evaporare aprendo poi il campione con strumenti diversi da quelli usati per il prelievo

Prodotti non confezionati:

Gli strumenti da utilizzare e le tecniche di prelievo variano in funzione dello stato fisico del materiale da prelevare (solido, liquido, in polvere, granuli, etc.) e del recipiente in cui è contenuto

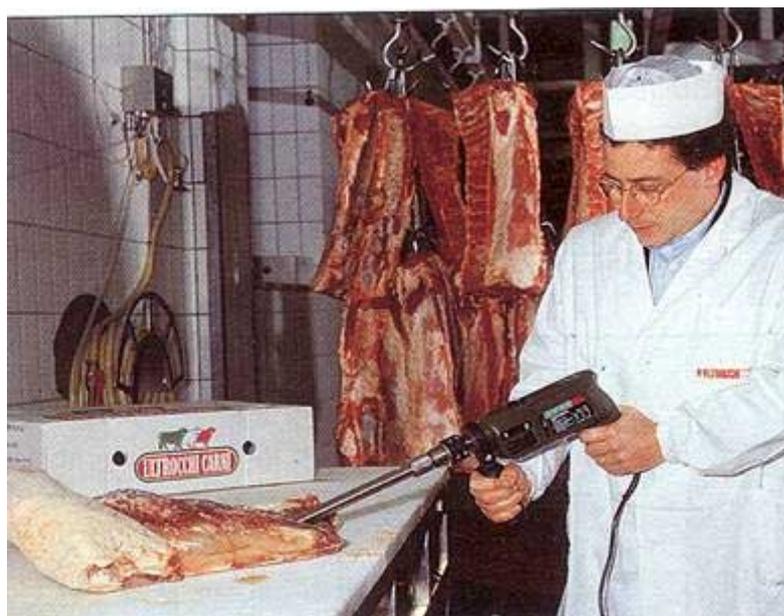
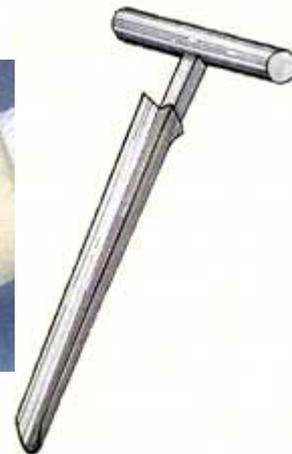
Prodotti solidi

strumenti utilizzabili:

- Pinze e forbici
- Coltelli
- Seghe
- Sonde metalliche di vario tipo



sonda per formaggi duri



sonda per carne congelata

Prodotti pastosi

strumenti utilizzabili:

- Spatole
- Cucchiaini
- Sonde metalliche di vario tipo ("a pistone", "a cucchiaio", etc.)

Il prelievo può risultare difficile quando il prodotto è molto vischioso. È indispensabile in questo caso mescolare bene tutta la massa prima di effettuare il prelievo avendo cura di staccare il prodotto aderente alle parti ed al fondo del recipiente.

Se si tratta di grassi in pani (esempio burro) il prelievo viene effettuato in due tempi mediante la sonda conica: dapprima diagonalmente, poi verticalmente verso il basso. Quando si tratta di prodotti quali le gelatine, si ricorre alla sonda a pistone formata da un tubo nel quale scorre internamente un pistone espulsore.

Per prodotti relativamente pastosi è valida la sonda a cucchiaio elicoidale che consente di portare in superficie gli strati inferiori del prodotto da campionare.



Sonda a pistone per sostanze pastose



Sonda elicoidale per creme o paste



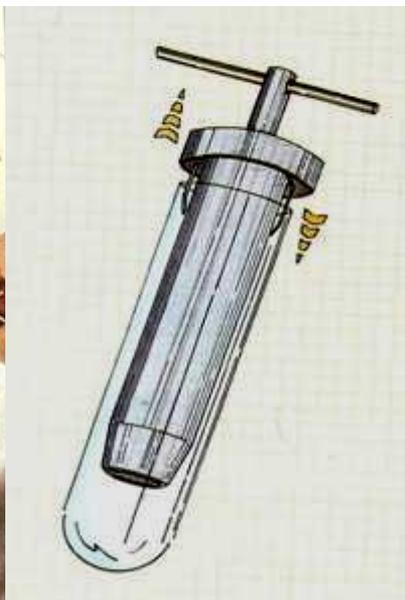
Gelati (analisi batteriologica)

Nel caso di prodotti sfusi, si provvede con spatola sterile ad eliminare una zona superficiale per la profondità di circa mezzo centimetro.



Spatola

Si inserisce la parte metallica della sonda cilindrica, utilizzando l'impugnatura, nel prodotto da prelevare. Con un movimento rotatorio e oscillatorio la si estrae e la si introduce nel provettone di vetro, che verrà conservato in posizione verticale, nell'apposito supporto ed in ambiente refrigerato sino all'inizio dell'analisi.



Gelato

Prodotti liquidi

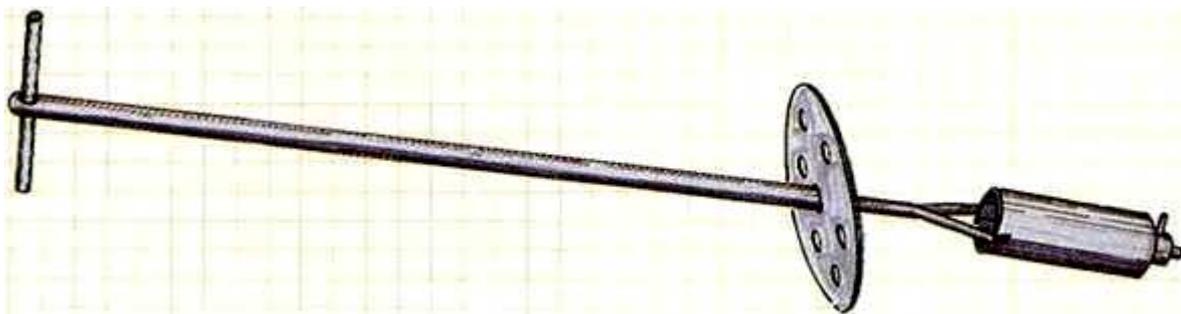
strumenti utilizzabili:

- Agitatore (disco metallico perforato)
- Agitatore con prelevatore
- Siringhe di vario tipo
- Mestoli
- Flaconi comandati da asta metallica

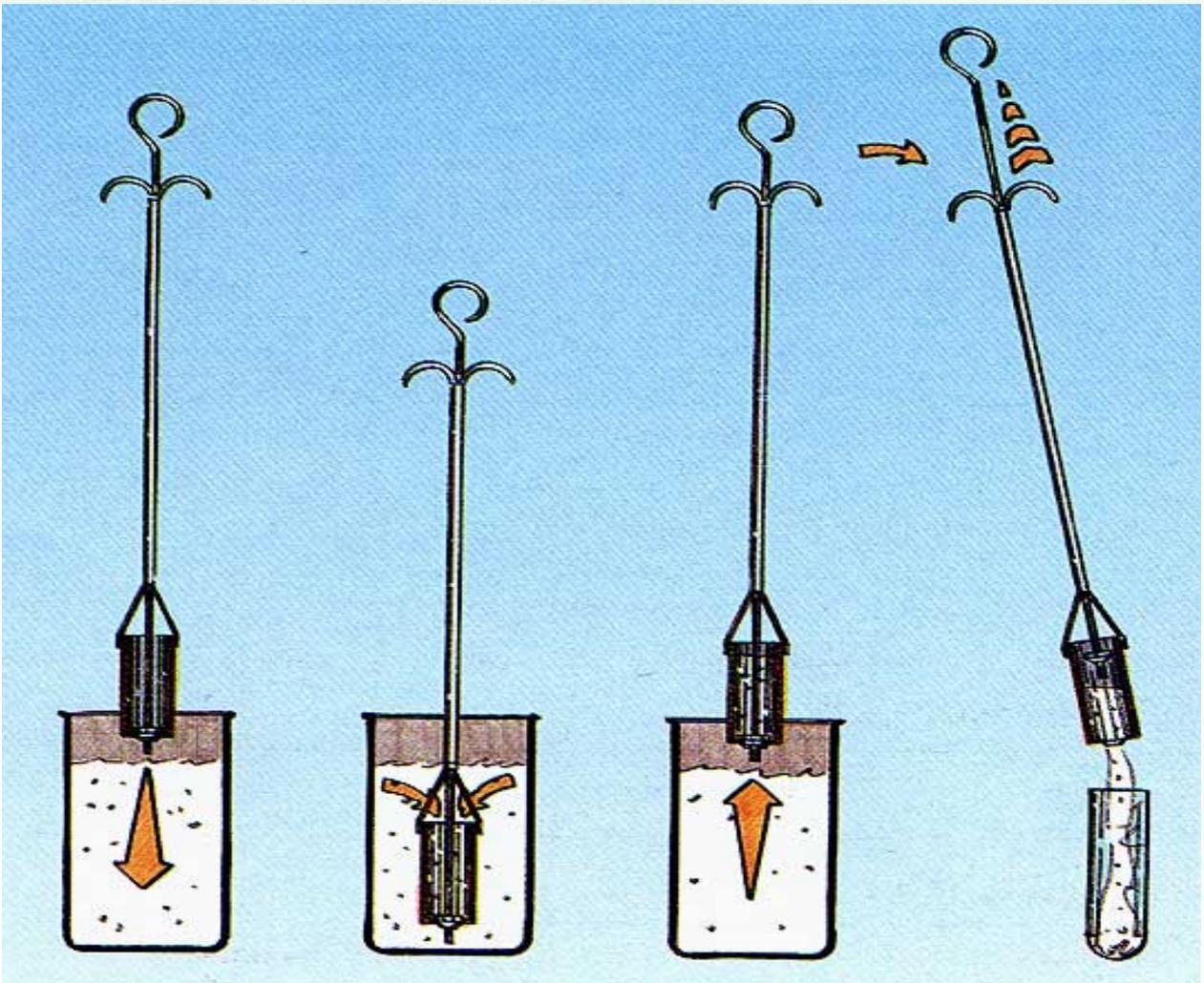
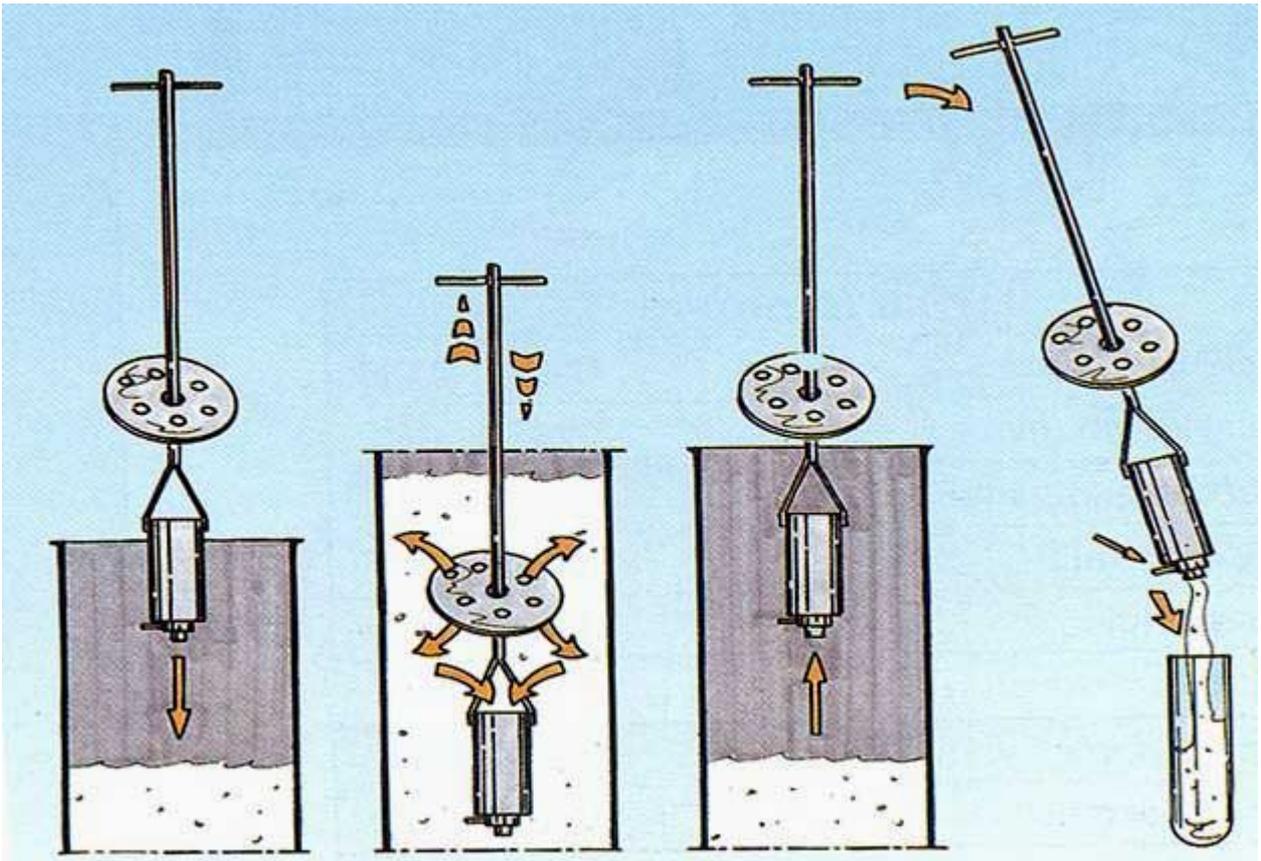
Il prelievo deve essere preceduto da una razionale mescolanza del prodotto, a causa di una possibile stratificazione dei vari componenti. Questa operazione può essere eseguita con mezzi meccanici o con un agitatore manuale costituito da un'asta con impugnatura e disco forato. Un corretto rimescolamento consente di disperdere in maniera omogenea i microrganismi presenti, soltanto in questo modo è possibile ottenere un campionamento rappresentativo della massa in esame



Il prelievo può avvenire mediante una sonda ad immersione dotata di un manico la cui lunghezza consenta l'introduzione sino alla parte centrale della massa liquida e di una valvola di scarico azionabile o a mano o per contatto con il bordo del recipiente che deve raccogliere il campione. Le capacità possono essere di 2, 10, 20, 40, 50, 100, 250 ml.



agitatore con prelevatore



Per liquidi densi o poco fluidi è consigliabile l'adozione del prelevatore a siringa dotato di tubo di aspirazione maggiorato in acciaio inox.

Per il prelievo superficiale ci si avvale di mestolo in acciaio inox della capacità di 30 ml o 200 ml.

Nel caso il prelievo debba essere effettuato a profondità diverse in pozzi o cisterne, si impiegano particolari «sampler» dotati di congegni che provocano l'apertura del flacone di prelievo alla voluta profondità, mediante un semplice «strappo» della fune di supporto.

Prodotti in polvereo granuli

strumenti utilizzabili:

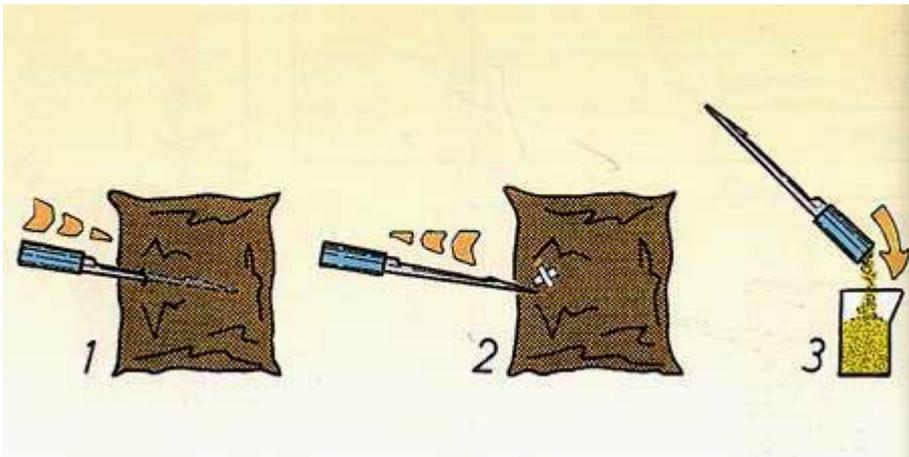
- Cucchiari
- Mestoli
- Sonde "a più settori"
- Sonde "ad ago"
- Sonde con "vite senza fine"

Per il prelievo da fusti e sacchi è, necessario effettuare campioni composti in quanto la pratica ha dimostrato che errori vistosi sono decisamente influenzati dalla parte di prodotto che si trova sul fondo ed al centro. Due sono i tipi di sonda che più si adattano allo scopo: la sonda a tre settori per sacchi normali e fusti e la sonda ad ago per sacchi di carta e polietene.

La prima (disponibile in tre differenti lunghezze: 550, 850 e 1500 mm) è formata da due pezzi concentrici ed è dotata di tre celle disposte lungo il suo asse. La sonda viene introdotta dall'alto verso il basso in modo che la punta possa facilitarne l'introduzione nella massa e raggiunga il fondo. Girando la parte interna della sonda, si provoca l'apertura delle tre celle che si riempiono così di polvere; si chiudono le celle eseguendo l'operazione inversa e si estrae la sonda. Il contenuto delle tre celle viene poi versato, con le cautele del caso, a seconda che si tratti di eseguire analisi chimiche o batteriologiche, in un recipiente e mescolato in modo da ottenere un campione omogeneo e sufficientemente rappresentativo.



sonda a più settori



sonda ad ago

Quando si tratta di sacchi di carta e polietene, si utilizza la sonda ad ago che dispone di una sola cella di prelievo e la polvere viene raccolta nell'interno del manico; il prelievo avviene forando l'involucro dall'esterno. Ultimato il prelievo, si deve chiudere immediatamente il foro praticato sulla parete del contenitore, applicando un nastro adesivo, per evitare contaminazioni, assorbimento di umidità; ecc.

Nel caso il prelievo venga effettuato in superficie e sia destinato ad accertamenti batteriologici; si avrà cura di eliminare con un cucchiaino sterile lo strato superiore.

Prelievo in profondità:

Se si deve eseguire un prelievo in profondità la porzione superficiale di prodotto da eliminare viene rimossa con un coltello o altro strumento sterile e per il prelievo si utilizza uno strumento sterile diverso da quello usato in precedenza.

2.b. quantità di materiale da prelevare

Spesso il campione viene prelevato in quantità insufficiente per le analisi richieste. La quantità di materiale necessaria può variare da un laboratorio ad un altro in dipendenza dei Metodi di Prova che vengono applicati. È importante che chi esegue i prelievi, in caso di dubbio, si metta in contatto con il laboratorio di riferimento per sapere che quantità di materiale è necessaria per gli esami da richiedere.

Considerando le richieste analitiche più frequenti 150-200 gr di prodotto sono quasi sempre sufficienti per eseguire tutte le principali determinazioni microbiologiche.

È bene prelevare, quando possibile, un multiplo della quantità strettamente necessaria per le analisi per avere una riserva di campione da utilizzare se si rendesse necessario ripetere gli esami.

Per particolari alimenti o per particolari ricerche sono necessari quantitativi diversi: ad esempio per gli esami da eseguire sui molluschi bivalvi (esame batteriologico e ricerca biotossine algali) è richiesto l'invio al laboratorio di almeno 2 kg di prodotto per aliquota (Cir. Regione Emilia-Romagna del 09/01/1997).

2.c. numero di aliquote o U.C. da prelevare

Se si richiedono sia esami batteriologici che esami chimici è necessario eseguire il prelievo in due aliquote.

Quando sono previsti, per determinati alimenti, piani di campionamento a "più classi" con prelievo di aliquote composte da più U.C. è indispensabile rispettare le indicazioni.

Piano a "due classi":

Viene applicato nella ricerca di microrganismi patogeni, es.: presente/assente; positivo/negativo

- Classe della "accettabilità"
- Classe della "non accettabilità"

Piano a "tre classi":

Viene applicato, ad es., nella ricerca di germi "indicatori".

Sono previste tre fasce di valutazione:

- I. Qualità accettabile: tutte le U.C. devono avere un numero di microrganismi inferiore o uguale ad un valore definito come "m";
- II. Qualità marginale: un certo numero di U.C. può superare il valore "m" senza però raggiungere il valore di "M". Tale numero è indicato con "c";
- III. Qualità inaccettabile: una o più unità campionarie hanno un numero di microrganismi uguale o superiore al valore di "M".

3. CONFEZIONAMENTO

Caratteristiche del contenitore ideale

- Sterile
- A tenuta ermetica
- Infrangibile
- Facilmente trasportabile
- Apertura "a bocca larga"
- Trasparente
- Presenza di una zona per l'identificazione

La scelta del contenitore (tipo e dimensione) viene fatta, in primo luogo, in rapporto alla matrice da campionare, in particolare, allo stato fisico dell'alimento (solido, liquido, ecc.)

Alcune delle caratteristiche elencate sono necessarie (ad es. la sterilità) altre sono da considerare soltanto preferenziali (ad es. la presenza di uno spazio in cui riportare i dati di identificazione).

Sterilità

E' un requisito fondamentale. La quasi totalità dei contenitori utilizzati è monouso ed è sterilizzata con i raggi gamma.

Tenuta ermetica:

E' un requisito fondamentale per:

- Esposizione al rischio di infezione.
- Possibile contaminazione del campione.
- Imbrattamento del Documento di Accompagnamento.

Se si impiegano sacchetti di plastica non introdurre materiali acuminati o taglienti che possano forare o lacerare il sacchetto. Se le saldature dei sacchetti tendono a cedere con facilità bisogna usare un doppio sacchetto

Infrangibilità:

Evitare, se non strettamente necessario, l'uso di vetro o altro materiale frangibile.

Facilità di trasporto (leggero e poco ingombrante):

Facilita chi esegue i prelievi ma facilita anche il laboratorio perché lo stoccaggio dei campioni in attesa della fine delle analisi richiederà uno spazio più ridotto e il successivo smaltimento avrà costi inferiori.

Apertura a "bocca larga"

Semplifica il prelievo e rende più agevole la gestione del campione da parte del laboratorio.

Trasparenza

Rende più difficile lo scambio di campioni e consente di valutare subito alcune caratteristiche del campione compresa una sua eventuale inidoneità.

Presenza di una zona per l'identificazione del campione

E' utile ma non necessaria. Usare penne o pennarelli indelebili.

Requisiti per il confezionamento del campione ufficiale

Una volta effettuato il prelievo, il contenitore deve essere riposto in un sacchetto di polietilene, costituente il "contenitore esterno" del campione, che deve rimanere integro sino al momento dell'analisi, questi deve essere chiuso con un cordino in modo inamovibile, ai capi del quale deve essere assicurato il cartellino di identificazione del campione e il tutto deve essere reso inviolabile per mezzo dell'apposizione di un piombo suggellato con la pinza recante impressa la dicitura dell'ufficio che ha disposto il prelievo. Se si campionano alimenti che a causa della loro conformità fisica possono la cera re il sacchetto, il confezionamento deve essere effettuato con due sacchetti di cui solo quello esterno sarà chiuso, identificato e piombato. Quando si prelevano alimenti deperibili, che devono perciò essere conservati nelle apparecchiature frigorifere, è buona norma proteggere il cartellino di identificazione dall'umidità e da eventuali distacchi accidentali ponendo il campione, identificato e suggellato, in un ulteriore sacchetto.

4. COMPILAZIONE DEL D.A. = verbale di prelievo

informazioni da riportare nel verbale o d.a.

Per poter procedere all'accettazione informatica di un campione è **indispensabile** disporre dei dati necessari relativi al proprietario, all'inviante e al materiale inviato. Il laboratorio dovrà comunicare agli interessati quali sono le informazioni minime da riportare nel D.A. e chi esegue i prelievi dovrà rispettare le indicazioni. Per quanto riguarda i campionamenti "legali", eseguiti ai sensi di specifiche norme, o quelli eseguiti nell'ambito di "piani" particolari esiste sempre una modulistica dettagliata da seguire. In mancanza dei dati necessari si è costretti a richiedere telefonicamente l'invio tramite fax dei dati mancanti con perdita di tempo sia da parte del laboratorio che del prelevatore. La completa conoscenza dei dati relativi al campione è molto importante anche perché consentirà di estrarre dati, riferiti all'attività complessiva, precisi e attendibili.

leggibilità

Troppo spesso si sottovaluta questo aspetto. Si verifica con una certa frequenza che alcuni dati siano completamente illeggibili oppure che vengano inseriti in maniera errata perché interpretati male. Le conseguenze di ciò sono, o una perdita di tempo per contattare l'interessato e chiedergli che cosa ha scritto, oppure la produzione di un Rapporto di Prova con dei dati errati e questo, in particolare, può avere dei risvolti poco piacevoli. Questi inconvenienti possono essere evitati ricorrendo all'uso dei timbri sia per quanto riguarda le generalità del proprietario che quelle del prelevatore.

sistemazione d.a.

E' buona regola mettere il D.A. in una busta fissata al contenitore esterno. Se il D.A. viene messo all'interno, insieme ai contenitori con i campioni, la busta con il verbale deve essere messa dentro a un sacchetto di plastica trasparente chiuso con nastro adesivo.

requisiti per la redazione del verbale in caso di campione ufficiale

Nel verbale di prelievo devono essere riportate tutte le indicazioni indispensabili all'identificazione del campione, alle modalità di campionamento, di trasporto, ecc. secondo quanto previsto dall'art. 15 del D.P.R. 327/80. Qualora si tratti di analisi non ripetibile, in particolar modo se la matrice è deperibile, è buona prassi comunicare al detentore e/o al produttore della merce campionata, il luogo, il giorno e l'ora dell'analisi, dopo aver concordato ciò con il laboratorio.

5. TRASPORTO AL LABORATORIO

E' stato detto all'inizio che il materiale prelevato deve giungere al laboratorio nelle stesse condizioni microbiologiche in cui si trova al momento del prelievo. Il momento in cui più facilmente si verificano problemi che modificano la situazione microbiologica del campione è proprio quello del trasporto al laboratorio. Questo è dovuto a:

- Manca il rispetto della giusta temperatura di conservazione.
- Tempi di conservazione troppo lunghi

Gli effetti sono particolarmente evidenti nei mesi caldi e soprattutto a carico dei parametri quantitativi.

Gli aspetti da prendere in considerazione sono i seguenti:

- Temperature di trasporto
- Contenitori per il trasporto
- Tempi di trasporto

temperature

In generale la temperatura di trasporto deve rispettare la temperatura di conservazione prevista per i diversi alimenti.

- | | |
|-------------------------|----------------------|
| • Prodotti stabili: | Temperatura ambiente |
| • Prodotti refrigerati: | Tra 0°C e +4°C |
| • Prodotti congelati: | Temperatura di -15°C |
| • Prodotti surgelati: | Temperatura di -18°C |

Per i prodotti deteriorabili, come specificato nel Decreto del 16 Dicembre 1993, il trasporto deve essere effettuato ad una temperatura non superiore a +4°C e non inferiore a 0°C. E' fondamentale che la catena del freddo sia rispettata scrupolosamente e che quindi venga periodicamente monitorata la temperatura di trasporto.

contenitori

I contenitori utilizzati per il trasporto del campione al laboratorio devono garantire il mantenimento della temperatura entro i valori indicati. La loro idoneità o meno si basa essenzialmente su questa caratteristica. In pratica si utilizzano i seguenti contenitori:

- Frigorifero portatile elettrico
- Contenitori coibentati con piastre refrigeranti

Per trasporti di lunga durata e/o in condizioni particolari i contenitori coibentati non sono solitamente in grado di mantenere la temperatura richiesta. Nei contenitori coibentati con piastre refrigeranti è importante non mettere i campioni a diretto contatto con le piastre.

I frigoriferi portatili devono essere portati alla temperatura di esercizio prima di eseguire il campionamento. E' bene non introdurre campioni caldi, bisogna per lo meno raffreddarli prima di metterli nel contenitore.

tempi

Il campione dovrebbe giungere al laboratorio nel minor tempo possibile. E' evidente però che esistono spesso motivi pratici che non consentono consegne rapide. E' importante che non si verifichi mai una interruzione della catena del freddo prima della consegna al laboratorio e che comunque la consegna, se non vi sono motivi che impongono consegne più rapide, avvenga entro 24-36 ore al massimo dal prelievo.

CAMPIONAMENTO MICROBIOLOGICO DI SUPERFICI

SUPERFICI CAMPIONABILI

Superfici biotiche:

Rientrano in questa categoria le superfici di carcasse animali o di parti anatomiche. Lo scopo principale dei prelievi effettuati su queste superfici è quello di valutare il livello di igiene della macellazione e/o delle operazioni di sezionamento

Superfici abiotiche:

Rientrano in questa categoria tutte le superfici presenti negli ambienti di produzione, di trasporto, e di stoccaggio. Da un punto di vista pratico quelle più importanti sono quelle che entrano in contatto diretto con gli alimenti (piani di lavoro, coltelli, impastatrici, tritacarne, affettatrici, ecc).

Gli scopi dei prelievi eseguiti in queste sedi sono:

- Valutare l'efficacia delle operazioni di detersione e di disinfezione eseguite a fine lavoro.
- Valutare lo stato igienico delle superfici.
- Individuare serbatoi di contaminazione.

DETERMINAZIONI BATTERIOLOGICHE

Determinazioni quantitative.

Consentono di ricercare il numero di microrganismi presenti per unità di superficie ovvero per cm². Le ricerche quantitative consentono di valutare la carica dei germi "indicatori" cioè di quei germi che non hanno importanza da un punto di vista sanitario e la cui presenza in quantità elevate sta ad indicare carenze igieniche. L'esame che fornisce le indicazioni più utili è la carica batterica totale (CBT)

Determinazioni qualitative.

Si utilizzano per la ricerca dei germi patogeni (ad es. *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes*). Il risultato viene espresso come presenza o assenza del patogeno ricercato in una superficie che, solitamente, è indeterminata. Eseguite su superfici di lavoro consentono di individuare eventuali serbatoi di contaminazione del prodotto

METODICHE DISPONIBILI

Tutte le tecniche utilizzate per il controllo microbiologico delle superfici rientrano in una delle seguenti tipologie:

- Prelievo dei germi mediante tampone, o materiale analogo, che viene strisciato sulla superficie, successivo trasferimento dei microrganismi presenti nel tampone a un liquido diluente che viene esaminato mediante semine in piastra
- Prelievo dei germi presenti con il ricorso a terreni di coltura solidi che vengono fatti aderire alla superficie in esame, dopo incubazione si contano le colonie che si sviluppano sul terreno di coltura
- Eluizione dei germi presenti mediante lavaggio della superficie, raccolta del liquido di lavaggio in apposito contenitore, esame batteriologico del liquido.
- Prelievo con metodo distruttivo. E' applicabile soltanto ad alcune superfici biotiche e prevede il distacco in sterilità di uno strato superficiale di circa 1 mm di spessore. Il materiale prelevato viene sospeso in un diluente nel quale mediante agitazione vengono trasferiti i germi presenti nel campione.

Non esiste un metodo adatto a tutte le situazioni e di volta in volta si dovrà scegliere tra i metodi disponibili quello più idoneo per la superficie da controllare. I principali fattori che condizionano la scelta sono i seguenti:

- Ricerche da effettuare
- Tipo di superficie (liscia, rugosa, bagnata, ecc..)
- Presunta carica microbica
- Risorse disponibili

Essendo la popolazione microbica distribuita in modo disomogeneo non sempre è possibile prelevare un campione rappresentativo, campioni prelevati in zone diverse della stessa superficie possono dare risultati discordanti tra loro. Come criterio generale più ampia è la superficie di prelievo maggiore è la probabilità di ottenere un risultato che rispecchia il reale stato microbico della stessa.

Qualunque sia il metodo utilizzato il recupero dei batteri presenti è sempre parziale e dipende dalla natura e dallo stato della superficie. Nelle superfici lisce la rimozione delle cellule batteriche è maggiore che nelle superfici porose o che presentano crepe o tagli; il recupero dei batteri è maggiore nelle superfici ben sgrassate che in quelle su cui sono presenti residui di grasso, inoltre si deve considerare che i batteri mostrano una più elevata aderenza sui materiali idrofobici: tra quelli maggiormente usati nell'industria alimentare, in ordine decrescente, si hanno il teflon, la gomma e l'acciaio

Ci occuperemo in dettaglio delle metodiche che rientrano nelle prime due tipologie elencate essendo quelle che vengono utilizzate con maggior frequenza. Nella prima tipologia rientrano i prelievi eseguiti mediante tampone o mediante spugnetta (sponge-bag). Nella seconda tipologia rientrano i prelievi eseguiti mediante "piastre a contatto" (RODAC), "slides" flessibili o sistemi analoghi.

PRELIEVO MEDIANTE TAMPONE

Materiale necessario:

- Tamponi in fibra (rayon, dacron) o in alginato di calcio. Esistono in commercio dei tamponi per prelievi ambientali
- Provetta di plastica con tappo "a tenuta"
- Liquido diluente
- "Delimitatore di area" sterile

Determinazioni effettuabili:

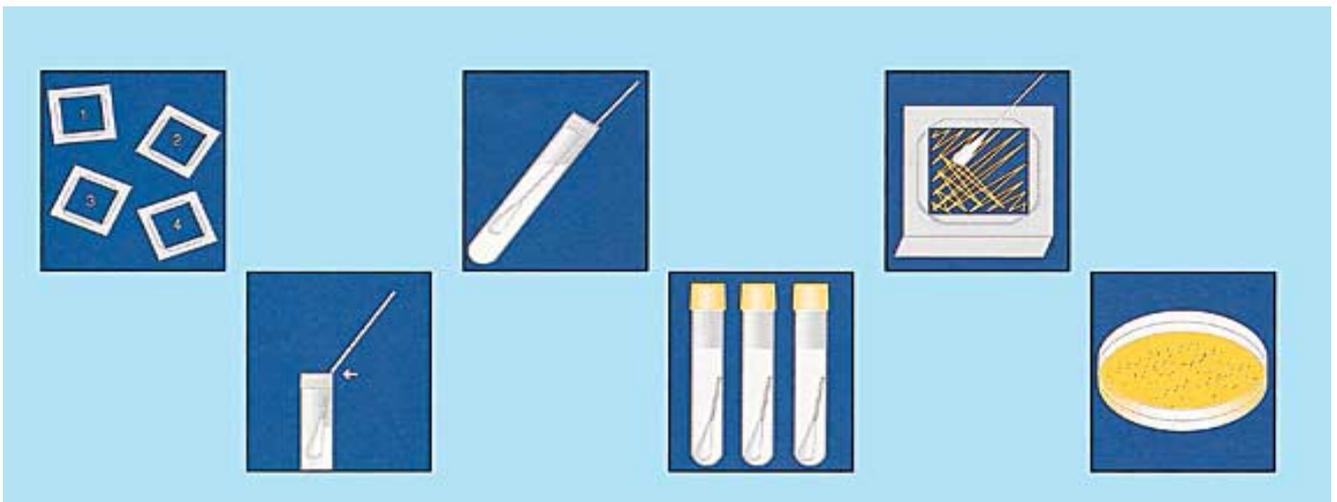
- Si possono effettuare sia determinazioni quantitative che qualitative.
- E' necessario prelevare un tampone per ogni esame qualitativo richiesto (ades. un tampone per ogni ricerca Salmonelle o ricerca Listerie).
- Per gli esami quantitativi invece con un solo tampone è possibile eseguire diverse determinazioni.

Tecnica di prelievo (Ricerche quantitative)

- La porzione di superficie su cui viene eseguito il prelievo deve essere limitata da un "delimitatore di area" costituito in genere da una mascherina sterile
- La dimensione della superficie di prelievo deve essere riportata nel D.A. In mancanza di questo dato sarà impossibile esprimere il risultato in UFC/cm²
- Nel caso si tratti di superfici di cui non è possibile misurare l'area bisognerà uniformare la superficie campionata, sarà così possibile confrontare i risultati dei prelievi avendo come riferimento, anziché l'unità di misura superficiale, l'intera superficie su cui è stato fatto il prelievo
- Una volta delimitata l'area da campionare si inumidisce il tampone con il liquido diluente facendo attenzione che non si imbibisca troppo, l'eventuale liquido in eccesso viene eliminato comprimendo il tampone contro la parete della provetta che contiene il diluente
- Il tampone deve essere strisciato sulla superficie compresa entro il "delimitatore di area" in modo da raccogliere quanto più possibile della carica batterica presente
- E' bene mantenere un angolo di incidenza dello stelo del tampone rispetto alla superficie di 30°, inoltre, mentre si striscia il tampone deve essere fatto ruotare in modo da utilizzare per il prelievo tutta la parte disponibile
- In genere lo striscio va effettuato in successione lungo due direzioni tra loro perpendicolari
- Il modo in cui vengono effettuate queste operazioni è critico e per poter confrontare i risultati di prelievi diversi è opportuno che le modalità di prelievo siano uniformi

- Dopo avere raccolto in questo modo i microrganismi presenti sulla superficie il tampone viene messo, lavorando in asepsi, nella provetta che contiene il diluente spezzando l'asta per eliminare la porzione eccedente e poter richiudere la provetta
- Il diluente, previa dispersione dei batteri adesi al tampone costituirà il materiale sul quale eseguire l'esame batteriologico
- Quando il campione non può essere esaminato immediatamente, come quasi sempre avviene, le provette vanno refrigerate rapidamente, mantenute a una temperatura non superiore a 4°C e inviate al laboratorio entro 24 ore
- I tempi di risposta variano, a seconda delle metodiche utilizzate e delle determinazioni richieste, dalle 24 alle 72 ore

METODO DEL TAMPONE



Tecnica di prelievo (Ricerche qualitative)

- Per gli esami qualitativi non è necessario definire l'estensione della superficie di prelievo ma l'area prelevata dovrà essere sufficientemente ampia
- Quando è richiesta l'esecuzione del prelievo su una superficie definita si usano dei "delimitatori di area".
- La tecnica di prelievo è uguale a quella descritta per le determinazioni quantitative

PRELIEVO MEDIANTE SPUGNETTA

Rappresenta una variante del prelievo con tampone in cui quest'ultimo viene sostituito con una spugna in cellulosa sterile. La prima descrizione di questo metodo di prelievo è abbastanza recente e risale al 1995. Negli ultimi anni il suo uso si è esteso sempre di più anche perché vi sono dei casi in cui il loro impiego viene reso, in pratica, obbligatorio. Rispetto al metodo del tampone quello della spugna presenta il vantaggio di poter effettuare il prelievo su una superficie più estesa e di avere una maggiore efficienza di prelievo nel caso in cui siano presenti consistenti biofilm o vi siano tagli, screpolature, ecc. perché permette di esercitare una pressione maggiore. L'indicazione d'uso preferenziale per le spugnette è pertanto per le superfici di grandi dimensioni e/o con maggiore presenza di materiale organico. L'unico svantaggio rispetto al tampone è costituito da una maggiore difficoltà nella "manualità" richiesta per eseguire il prelievo.

Materiale necessario:

- Spugnette sterili disidratate di cellulosa di circa 3,5 x 7,5 cm contenute in sacchetti di plastica sterili tipo "presto chiuso"
- Soluzione sterile per reidratazione
- Guanti sterili o pinza sterile
- "Delimitatore di area" sterile

Determinazioni effettuabili:

valgono le stesse cose che sono state dette per il metodo del tampone

Tecnica di prelievo (Ricerche quantitative):

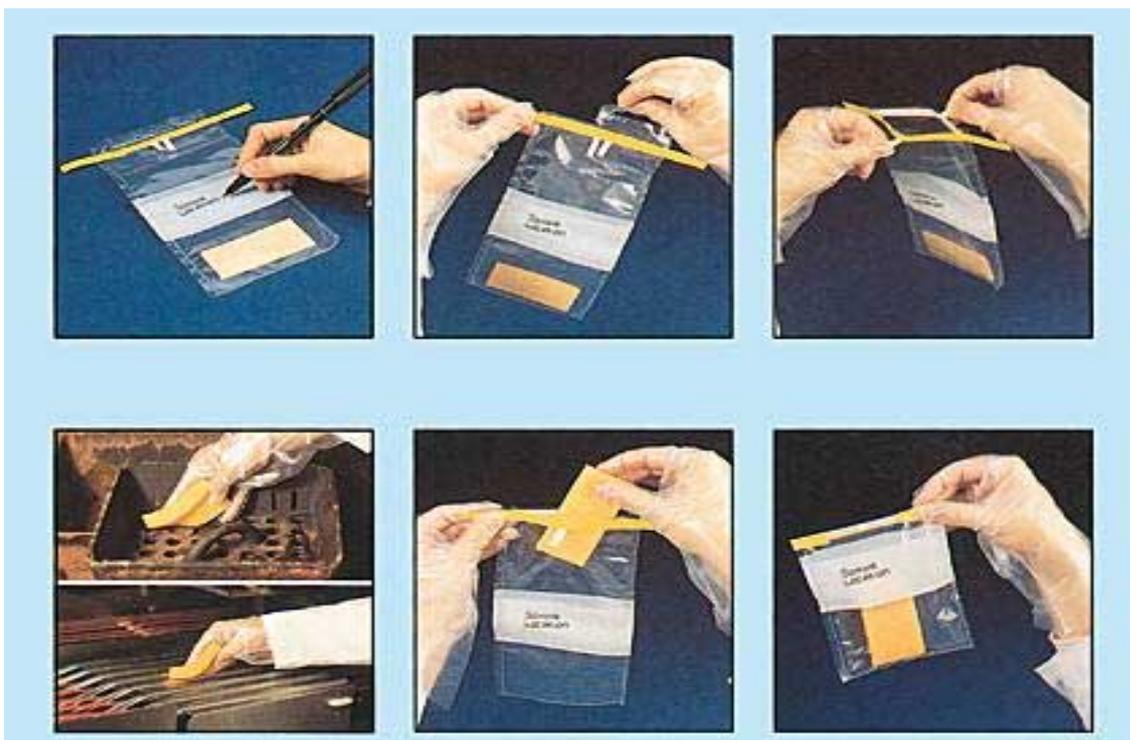
- Le spugnette sterili prima dell'uso devono essere reidratate
- Per fare questo si apre il sacchetto tirando verso l'esterno le apposite linguette e si versano 7-8- ml di soluzione reidratante
- Si richiude il sacchetto e lo si massaggia dall'esterno per favorire la reidratazione
- E' importante non usare quantità maggiori di soluzione reidratante per evitare un eccesso di imbibizione e il gocciolamento (max 9 ml)
- Quando la spugna è ben reidratata si spinge dall'esterno verso l'imboccatura del sacchetto, si apre di nuovo il sacchetto tirando le linguette
- a questo punto si indossano i guanti sterili (*nelle foto c'è un errore*)
- Con la mano guantata, evitando di toccare superfici non sterili, si prende la spugna inumidita e la si striscia con sufficiente energia all'interno dell'area precedentemente delimitata, prima in senso verticale poi in senso orizzontale
- Al termine del prelievo la spugna viene rimessa nel sacchetto in cui era contenuta si aggiunge un volume noto di soluzione dello stesso tipo di quella usata per la reidratazione, si comprime il sacchetto per favorire l'uscita dell'aria e si chiude arrotolando più volte il bordo superiore
- Per poter esprimere il risultato in UFC/cm² bisognerà indicare sul D.A. sia l'estensione della superficie campionata che il volume complessivo di soluzione reidratante utilizzata
- Per poter esprimere il risultato come riferito ad una superficie "non determinata" bisognerà indicare nel D.A. soltanto il volume di soluzione reidratante utilizzata
- Per la conservazione del campione dopo il prelievo, tempi di risposta e espressione del risultato non cambia nulla rispetto a quanto detto per i prelievi con tampone

Tecnica di prelievo (Ricerche qualitative)

In genere per la ricerca dei patogeni vengono campionate superfici estese e in certi casi può essere necessario utilizzare 2 o 3 spugnette per lo stesso prelievo

La tecnica di prelievo è la stessa già descritta per i prelievi per esami quantitativi.

METODO DELLA SPUGNETTA



Aspetti positivi delle metodiche di prelievo con tampone o spugnetta: si possono:

- eseguire esami quantitativi e qualitativi
- eseguire prelievi su superfici estese
- campionare superfici non lisce e irregolari
- esaminare superfici con elevato carico microbico
- campionare superfici biotiche e abiotiche

Aspetti negativi delle metodiche di prelievo con tampone o spugnetta:

- Sono tecniche abbastanza indaginose che richiedono un certo rigore applicativo
- Il campione dopo il prelievo deve essere gestito rispettando temperature e tempi definiti
- Il campione prelevato deve essere esaminato da un laboratorio specializzato

PRELIEVO MEDIANTE PIASTRE A CONTATTO

Materiale necessario

- Si impiegano piastre dette RODAC
- Queste piastre hanno una superficie di 24cm² e vengono riempite, con terreni agarizzati di diverso tipo in funzione dei microrganismi che si vogliono ricercare, in modo da ottenere un menisco convesso che sporge rispetto al bordo della piastra
- Il fondo delle piastre è solitamente quadrato con quadrati di 1x1 cm per facilitare il conteggio

Determinazioni effettuabili:

è possibile eseguire solo determinazioni quantitative su superfici di lavoro

Tecnica di prelievo

- Il prelievo si esegue appoggiando le piastre RODAC sulle superfici di cui si vuole misurare la carica batterica
- I batteri presenti (o almeno una parte di essi) rimarranno adesi alla superficie del terreno colturale ottenendo così una "impronta microbiologica" della superficie campionata
- Il tempo di contatto terreno/superficie dovrà essere di circa 10 secondi
- Il tempo di contatto tra piastra e superficie e la pressione esercitata sulla piastra costituiscono le due variabili principali che devono essere standardizzate per poter avere risultati confrontabili
- Per uniformare questi due parametri sono stati messi in commercio dei dispositivi denominati "RODAC weight" che consentono di applicare sempre la stessa pressione per lo stesso tempo sulla piastra a contatto
- Dopo il prelievo le piastre vengono chiuse e messe in termostato ad incubare alla temperatura voluta
- Dopo incubazione si contano le colonie che si sono sviluppate esprimendo il risultato in UFC/cm² o in UFC/24cm²
- Un conteggio accurato può essere effettuato solo sulle piastre nelle quali non siano cresciute più di 200 colonie
- La rappresentatività del prelievo eseguito su 24 cm² è scarsa per cui in certi casi bisogna aumentare il numero delle piastre utilizzate con conseguente aumento dei costi

- Esistono prodotti analoghi alle piastre RODAC come ad es. gli “slides” flessibili e i Petrifilm. Il principio che utilizzano è lo stesso e dal punto di vista sostanziale non cambia nulla rispetto all’uso delle piastre



METODO “RODAC”



METODO DELLO “SLIDES” FLESSIBILE

Aspetti Positivi delle metodiche di prelievo con piastre RODAC o sistemi analoghi:

- Estrema praticità di impiego
- Dopo il prelievo il campione può essere gestito con una certa elasticità
- Per eseguire gli esami non è necessario ricorrere al laboratorio

Aspetti negativi delle metodiche di prelievo con piastre RODAC o sistemi analoghi:

- E’ possibile eseguire solo esami quantitativi
- Si possono campionare soltanto superfici piane e lisce
- Si possono eseguire prelievi solo su superfici poco contaminate
- Non si possono campionare superfici “biotiche”

INATTIVAZIONE RESIDUI DI DISINFETTANTI

E’ stato detto in precedenza che uno degli scopi principali, se non quello principale, del controllo microbiologico delle superfici di lavoro è quello di verificare l’efficacia delle operazioni di deterzione e disinfezione. E’ possibile che dopo le disinfezioni eseguite a fine lavoro rimangano sulle superfici tracce di disinfettante. Gli eventuali residui possono esercitare un effetto negativo sulla crescita dei batteri prelevati dalla superficie e per eliminare l’interferenza provocata dai residui di disinfettanti, che potrebbe portare a una sottostima della popolazione microbica presente, bisogna neutralizzare gli effetti antibatterici dei disinfettanti. Questo si ottiene aggiungendo al liquido diluente o al terreno agarizzato delle piastre RODAC opportune quantità di determinate sostanze che inattivano le diverse classi di disinfettanti. Esistono in commercio delle miscele inattivanti capaci di neutralizzare contemporaneamente gli effetti antibatterici dei più comuni disinfettanti che vengono usati come liquido diluente nel caso esista il sospetto della presenza di residui di disinfettanti

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Gli standard di riferimento, intesi come valori che informano sulla qualità del processo nonché sulla salubrità dell'alimento, sono ricavati da:

1. norme italiane e/europee (si tratta di valori cogenti da non superare);
2. fonti autorevoli (letteratura scientifica o linee guida di organizzazioni accreditate come International Commission on Microbiological Specification for Foods, Organizzazione Mondiale della Sanità, Istituto Superiore di Sanità, ecc.);
3. standard aziendali, se individuati e calcolati nell'ambiente oggetto del controllo in funzione dell'attività svolta (standard interni di qualità); ovviamente devono essere inferiori allo standard di legge, quando esistente, o a quelli derivanti da fonti autorevoli.

Lo standard aziendale di qualità è calcolato sperimentalmente in relazione al rispetto delle G.M.P. e del sistema HACCP.

Per costruire lo standard aziendale occorre:

- controllare che la produzione avvenga applicando regolarmente le G.M.P.;
- prelevare una serie di campioni da più lotti (almeno 10 campioni da 10 lotti) ed analizzarli;
- ordinare i risultati ottenuti secondo una distribuzione di frequenza;
- prendere in considerazione il valore che è inferiore al novantacinquesimo percentile dei valori ottenuti o al novantanovesimo percentile;
- individuare il valore di riferimento ad un livello uguale o appena superiore a quello prima calcolato.

Il valore standard ottenuto deve comunque essere distante almeno 2 logaritmi dai livelli di rischio per la salute o dalla dose in cui iniziano fenomeni degenerativi del prodotto.

I valori di riferimento individuati devono essere controllati costantemente e aggiornati in funzione dei dati epidemiologici, microbiologici, chimici e dei riferimenti normativi.

A titolo di indicazione si riportano i valori ritenuti accettabili in ambienti di lavorazione sottoposti a una forte pressione inquinante, come i laboratori di sezionamento carne, ricavati da una pubblicazione recente.

- Per superfici lisce come l'acciaio sono ritenuti accettabili CBT entro le 50 UFC/cm² e marginalmente accettabili entro le 100 UFC/cm²
- Per i coliformi totali i valori di riferimento sono, rispettivamente, di < 1 UFC/cm² ed entro le 5 UFC/cm²
- Per taglieri in teflon questi valori sono difficilmente ottenibili nella pratica quotidiana per cui si possono ritenere accettabili CBT fino a 200 UFC/cm² e marginalmente accettabili entro le 400 UFC/cm². Per i coliformi totali i valori di riferimento sono, rispettivamente, di < 5 UFC/cm² e entro le 20 UFC/cm²

Il metodo di prelievo utilizzato è quello mediante tampone

Ulteriori esempi di standard di riferimento:

Superfici:

SUBSTRATO	SPECIE	LIMITE	UNITA' DI MISURA	METODO DI RILEVAZIONE	FONTE
superficie pulita	CBT	≤ 50 buono ≤ 10 ² accettabile	UFC/cm ²	tampone	Parisi e Giaccone (1991)
	coliformi fecali e/o enterococchi	≤ 1 buono ≤ 5 accettabile			
superficie sporca	CBT	≤ 10 ³ buono ≤ 5x 10 ³ accettab.	UFC/cm ²	tampone	Parisi e Giaccone (1991)
	coliformi fecali e/o enterococchi	≤ 10 buono ≤ 50 accettabile			
pavimento	CBT	≥ 50 insuff. 26-50 accettab. 0-25 buono	UFC/piastra	piastra a contatto	Casa Produttrice
parete	CBT	≥ 25 insuff. 16-25 accettab. 0-15 buono	UFC/piastra	piastra a contatto	Casa Produttrice
tavoli, nastri attrezzature macelli bovini/equini	CBT	≤ 10 ²	UFC/cm ²	tampone su 20 cm ²	Linee Lombardia Guida
	E. coli	≤ 5			
piano di lavoro	CBT	≥ 25 insuff. 16-25 accettab. 0-15 buono	UFC/piastra	piastra a contatto	Casa Produttrice
lavello	CBT	≥ 15 insuff. 6-15 accettab. 0-5 buono	UFC/piastra	piastra a contatto	Casa Produttrice
recipiente	CBT	≥ 15 insuff. 6-15 accettab. 0-5 buono	UFC/piastra	piastra a contatto	Casa Produttrice
superficie pulita	CBT	< 5 ottimo 5-25 buono 25 - 10 ² sufficiente 10 ² - 10 ⁴ non adeguato > 10 ⁴ inaccettabile	UFC/cm ²		Dossier n. 17 Regione Emilia Romagna/SEDI “Metodi analitici per lo studio delle matrici alimentari” 1993
	<i>Staphylococcus aureus</i>	assente			
	<i>Salmonella spp.</i>	assente			
	<i>Listeria monocytogenes</i>	assente			

Alimenti

SUBSTRATO	SPECIE	LIMITE	UNITA' DI MISURA	METODO DI RILEVAZIONE	FONTE
carcasse prima del raffreddamento	CBT	10 ⁶	UFC/cm ²	metodo distruttivo	ICMSF (Circ. E-R N°8/1992)
carcasse raffreddate e tagli anatomici	CBT	10 ⁷	UFC/cm ²	metodo distruttivo	ICMSF (Circ. E-R N°8/1992)
carcasse congelate	CBT	10 ⁷	UFC/gr	metodo distruttivo	ICMSF (Circ. E-R N°8/1992)
carni disossate e congelate (bovino adulto, vitello, suino, ovino)	CBT	10 ⁷	UFC/gr	metodo distruttivo	ICMSF (Circ. E-R N°8/1992)
frattaglie raffreddate	CBT	10 ⁷	UFC/gr	metodo distruttivo	ICMSF (Circ. E-R N°8/1992)
frattaglie congelate	CBT	10 ⁷	UFC/gr	metodo distruttivo	ICMSF (Circ. E-R N°8/1992)
carcasse bovine/equine prima del raffreddamento	CBT	10 ⁵	UFC/cm ²	20 cm ² di carcassa (fascia mm. anconeo sx e fascia mm. quadricipite femorale dx)	Linee Lombardia Guida
	E. coli	10 ²			
carcasse suine prima del raffreddamento	CBT	10 ⁴ -10 ⁶	UFC/cm ²	10 cm ² di cotenna da gola o inguine o piastre di contatto	Linee Lombardia Guida
	enterobatteri	10 ³			
	Strept. fecali	10 ²			
	Staf coag. + Clostridi s.r	10 ²			
carcasse bovine/equine /suine raffreddate e tagli anatomici	CBT	10 ⁵	UFC/cm ²	20 cm ²	Linee Lombardia Guida
	E. coli	10 ²			
	Stafilococchi	10 ²			
	Salmonella spp.	assente			
carni di tutte le specie	Salmonella spp.	assente	25 gr	metodo distruttivo	(Circ. E-R N°8/1992)
carni suine	Yersinia enterocolitica (biosierotipi patogeni)	assente	25 gr	metodo distruttivo	(Circ. E-R N°8/1992)
carni bovine e suine fresche	CBT	m M 10 ⁵ 10 ⁶	UFC/gr		Tiecco 1997/2000 ISS – 1985
	E. coli	m M c n 10 10 ² 2 5			
	Staphyil. aureus	10 10 ² 2 5			
	Salmonella spp.	assente			
	Listeria monocytogenes	11 110	g/1 u.c. g/2 u.c.		O.M. Sanità 07.12.93

SUBSTRATO	SPECIE	LIMITE	UNITA' DI MISURA	METODO DI RILEVAZIONE	FONTE	
carni suine sezionate	CBT	m M c 10 ⁶ 5x10 ⁶ 2	UFC/gr	50 gr	Linee Guida Lombardia	
	coliformi	10 ⁵ 5x10 ⁵ 1				
	Staf coag. +	50 5x10 ² 1				
	clostridi s.r.	10 10 ²				
	<i>Listeria monocytogenes</i>	assente				
carni avicunicole	CBT	m M c n 10 ⁶ 10 ⁷ 2 5	UFC/gr		Dossier n. 37 Reg. E-R, CDS AUSL Bo Ra "Centri di produzione pasti, guida per l'applicazione del sistema HACCP" 1998; Gelosa L. in Industrie Alimentari - 1998;	
	<i>E. coli</i>	10 ² 10 ³ 2 5	UFC/gr			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ² 10 ³ 2 5	UFC/gr			
	<i>Salmonella spp.</i>	assente	25 gr			
	<i>Listeria monocytogenes</i>	11 110	g/1 u.c. g/2 u.c.			O.M. Sanità 07.12.93
carni di pollo	<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	assenti	25 gr	distruttivo	Circ. E-R N°8/1992	
carni avicole crude fresche e congelate	CBT	10 ⁷	UFC/gr	distruttivo	Circ. E-R N°8/1992	
carni suine trite	CBT	10 ⁵ - 5x10 ⁷	UFC/g	distruttivo	Linee Guida Lombardia	
	coliformi	10 ⁴				
	Staf coag. +	10 ³				
	Strept. fecali	10 ³				
	Clostridi s.r.	10 ²				
carni crude macinate (bovine, suine, ovicaprine)	CBT	m M c n 5x10 ⁵ 5x10 ⁶ 2 5	UFC/gr	distruttivo	ALL. II D.P.R, n.309 del 03.08.98	
	<i>E. coli</i>	50 5x10 ² 2 5				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ² 5x10 ³ 2 5				
	<i>Salmonella spp.</i>	assente 0 5				10 gr
preparazioni di carni	CBT	m M c n 5x10 ⁶ 5x10 ⁷ 2 5	UFC/gr	distruttivo	Gelosa L. in Industrie Alimentari - 1998 ALL. IV D.P.R, n.309 del 03.08.98	
	<i>E. coli</i>	5x10 ² 5x10 ³ 2 5				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	5x10 ² 5x10 ³ 1 5				
	<i>Salmonella spp.</i>	assente 0 5				1 gr

SUBSTRATO	SPECIE	LIMITE	UNITA' DI MISURA	METODO DI RILEVAZIONE	FONTE
prosciutti crudi, salumi maturazione (salami, coppe, ecc.)	CBT a 32°C per 44-48 h	m M c n 5x10 ⁴ 5x10 ⁵ 2 5	UFC/gr		Rondinini G. Igiene Alimenti-Disinfestazione & Igiene Ambientale – Luglio/Agosto 1997; Gelosa L. in Industrie Alimentari – 1998
	Clostridi solfito riduttori a 37°C per 20 h	10 5x10 ² 2 5			
	<i>E. coli</i>	3 11 2 5	MPN/gr		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	5x10 5x10 ² 2 5	UFC/gr		
	<i>Clostridium perfigens</i>	10 10 ² 2 5			
	<i>Listeria monocytogenes</i>	assente 0 5	25 gr		
	<i>Salmonella spp.</i>	assente 0 5	25 gr		
prod. cotti e stufati (prosciutto cotto, mortadella, wurstel ecc.)	CBT a 32°C per 44-48 h	m M c n 10 ³ 10 ⁴ 2 5	UFC/gr		Rondinini G. Igiene Alimenti-Disinfestazione & Igiene Ambientale – Luglio/Agosto 1997; Gelosa L. in Industrie Alimentari – 1998
	Clostridi solfito riduttori	10 10 ² 2 5			
	<i>E. coli</i> a 37°C per 20-24 e 44-48 h	3 11 2 5	MPN/gr		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 10 ² 2 5	UFC/gr		
	<i>Clostridium perfigens</i>	10 10 ² 2 5			
	<i>Listeria monocytogenes</i>	assente 0 5	25 gr		
	<i>Salmonella spp.</i>	assente 0 5	25 gr		
uova intere fresche	<i>Salmonella spp.</i>	assente	sul guscio sul tuorlo	ricerca su 10 uova	Circ. telegrafica Min. Sanità n. 55753 del 3.12.91
ovoprodotti	CBT	10 ⁵	UFC/gr o ml		D. Lgs. n. 65 del 4.2.93
	Enterobatteri	10 ⁷	UFC/gr o ml		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	assente	1 gr o ml		
	<i>Salmonella spp.</i>	assente	25 gr o ml		
pasticceria artigianale farcita	CBT a 30°C	m M c n 10 ⁵ 10 ⁶ 2 5	UFC/gr		Decreto Netherlands n. 563/79; Deliberazione n. 5310/94 Giunta Reg. Umbria; Tiecco 2000
	Coliformi	10 ² 10 ³ 2 5			
	<i>E. coli</i>	0 10 2 5			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 10 ² 2 5			
	<i>Salmonella spp.</i>	assente 0 5	25 gr		
pasticceria industriale farcita	CBT a 30°C	m M c n 10 ⁵ 10 ⁶ 2 5	UFC/gr		Decreto Netherlands n. 563/79; Deliberazione n. 5310/94 Giunta Reg. Umbria; Tiecco 2000
	Coliformi	10 ² 10 ³ 2 5			
	<i>E. coli</i>	0 10 2 5			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 10 ² 2 5			
	<i>Spore anaerobi solfito riduttori</i>	10 10 ² 2 5			
	<i>Salmonella spp.</i>	assente 0 5	25 gr		

SUBSTRATO	SPECIE	LIMITE	UNITA' DI MISURA	METODO DI RILEVAZIONE	FONTE
pasta all'uovo industriale secca	CBT a 32°C	m M c n 10 ⁴ 10 ⁶ 2 5	UFC/gr		Circ. MinSan n.32 2/8/85
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ² 10 ³ 2 5			
	<i>Salmonella spp.</i>	assente 0 5	25 gr		
pasta farcita industriale fresca con fezionata	CBT a 32°C	m M c n 10 ⁵ 10 ⁶ 2 5	UFC/gr		Circ. MinSan n.32 2/8/85
	<i>Clostridium perfringens</i>	10 ² 10 ³ 1 5			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ² 5x10 ² 2 5	25 gr		
	<i>Salmonella spp.</i>	assente 0 5			
pasta all'uovo artigianale fresca non con fezionata	CBT a 32°C	m M c n 10 ⁵ 10 ⁶ 2 5	UFC/gr		Circ. MinSan n.32 2/8/85
	Coliformi	10 ³ 10 ⁴ 1 5			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ³ 10 ⁴ 2 5	25 gr		
	<i>Salmonella spp.</i>	assente 0 5			
pasta farcita artigianale fresca non con fezionata	CBT a 32°C	m M c n 10 ⁵ 10 ⁶ 2 5	UFC/gr		Circ. MinSan n.32 2/8/85
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ³ 10 ⁴ 2 5			
	<i>Salmonella spp.</i>	assente 0 5	25 gr		
pasta farcita precotta surgelata	CBT a 32°C	m M c n 10 ⁵ 3x10 ⁵ 2 5	UFC/gr		Circ. MinSan n.32 2/8/85
	<i>E. coli</i>	assente 0 5			
	<i>Clostridium perfringens</i>	< 30 5	25 gr		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<10 ² 5			
	<i>Salmonella spp.</i>	assente 0 5			
preparazioni multingredienti pronte per il consumo (insalata russa, insalate di pollo, ecc)	CBT a 30°C	m M c n 10 ⁶ 10 ⁷ 2 5	UFC/gr		Mossel "Essential of microbiology of food", ed. John Wilaeey & Sons, 1995
	<i>E. coli</i>	0 10 2 5			
	<i>Bacillus cereus</i>	10 ² 10 ³ 2 5	25 gr		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ² 10 ³ 2 5			
	<i>Listeria monocytogenes</i>	assente 0 5			
	<i>Salmonella spp.</i>	assente 0 5			

surgelati

SUBSTRATO	SPECIE	LIMITE	UNITA' DI MISURA	METODO DI RILEVAZIONE	FONTI
alimenti precucinati surgelati	CBT coliformi	3×10^5 $\leq 10^5$	UFC/gr	distruttivo	Circ. Min. n. 81 del 21.09.1978
	<i>E. coli</i>	≤ 10 assente in 0.1 gr			
	anaerobi solfito-riduttori (forme vegetative e spore; incubazione a 46°C)	≤ 30			
	<i>Stafilococcus aureus</i>	$\leq 10^2$ assente in 0.01 gr			
	<i>Salmonella spp.</i> <i>Listeria</i>	assenti			
	carni avicole cotte e congelate da riscaldare prima di essere consumate	Stafilococchi	10^4	UFC/gr	
carni e preparazioni di carni surgelate	CBT	m M c n 5×10^5 5×10^6 2 5	UFC/gr		Raccomandazione 022/93 Istituto Italiano Alimenti Surgelati
	<i>E. coli</i>	50 5×10^2 1 5			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	50 5×10^2 1 5			
	Anaerobi solfito riduttori	10 10^2 2 5			
	<i>Salmonella spp.</i>	assente 0 5			
	<i>Listeria monocytogenes</i>	11 110	g/1 u.c. g/2 u.c.	O.M. Sanità 07.12.93	
piatti precucinati surgelati	CBT	$< 3 \times 10^5$	UFC/g		Raccomandazione 022/93 Istituto Italiano Alimenti Surgelati
	Coliformi	$< 10^5$			
	<i>E. coli</i>	< 10			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	$< 10^2$			
	<i>Salmonella spp.</i>	assente			
	<i>Listeria monocytogenes</i>	11 110	g/1 u.c. g/2 u.c.	O.M. Sanità 07.12.93	
vegetali semplici surgelati	CBT	m M c n 10^5 10^6 2 5	UFC/g		Raccomandazione 022/93 Istituto Italiano Alimenti Surgelati
	Coliformi	3×10^2 3×10^3 2 5			
	<i>E. coli</i>	10 10^2 2 5			
	<i>Listeria monocytogenes</i>	11 110			

SUBSTRATO	SPECIE	LIMITE	UNITA' DI MISURA	METODO RILEVAZIONE	DI	FONTE
snacks salati e dolci, pizze, crepes surgelati	CBT	m M c n 5x10 ⁵ 5x10 ⁶ 2 5	UFC/g			Raccomandazione 022/93 Istituto Italiano Alimenti Surgelati
	Coliformi	3x10 ² 3x10 ³ 2 5				
	<i>E. coli</i>	10 10 ² 1 5				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 10 ² 2 5				
	<i>Listeria monocytogenes</i>	assente	1 gr			
frutta surgelata	CBT	m M c n 10 ⁵ 10 ⁶ 2 5	UFC/g			Raccomandazione 022/93 Istituto Italiano Alimenti Surgelati
	Coliformi	10 ² 10 ³ 2 5				
	<i>E. coli</i>	10 10 ² 2 5				
	lieviti e muffe	10 ³ 10 ⁴ 2 5				
	<i>Listeria monocytogenes</i>	11 110	g/1 u.c. g/2 u.c.			O.M. Sanità 07.12.93

Cotti:

cibi cotti	CBT	10 ³	UFC/g	distruttivo	Circ E-R N°8/1992
	coliformi	assenti			
gelatina roast beef patè	Stafilococchi	10 ⁴	UFC/g	distruttivo	ICMSF Circ E-R N°8/1992
	<i>Cl. perfringens</i>	10 ⁴			
	<i>Salmonella spp.</i> <i>Listeria</i>	assente	assente		

GLOSSARIO

piano di campionamento	indica i criteri di scelta di un campione di alimenti da sottoporre ad analisi
campione casuale	l'insieme di unità campionarie selezionate da un lotto predefinito, in modo tale che ciascuna unità campionaria abbia la stessa probabilità di essere estratta, solitamente per la scelta si ricorre alle tavole dei numeri casuali (può essere formato da 1 a 5 aliquote)
aliquota	può essere costituita da un unità campionaria oppure può derivare dalla miscelazione di più unità campionarie
unità campionaria	una porzione singola, o una confezione, scelta a caso
intervallo di confidenza	intervallo di valori, calcolato dai dati del campione, che con una certa probabilità (pari al livello di confidenza, di solito il 95%) permette di essere nel giusto affermando che il vero valore del parametro studiato è compreso all'interno dell'intervallo stesso.
M	soglia limite di accettabilità oltre il quale i risultati non sono più ritenuti soddisfacenti
m	soglia limite al di sotto della quale tutti i risultati sono ritenuti soddisfacenti
n	numero di unità aliquote complessive
c	n di unità campionarie che possono dare risultati compresi nell'intervallo tra M e m → accettabile

BIBLIOGRAFIA

- a) Atti del Convegno " IL CORRETTO CAMPIONAMENTO. La base di ogni analisi di laboratorio veramente significativa Aspetti pratici, normativi e statistici" . 1997, AA.VV, Casa editrice LAB.E.U.T.A.- Milano
- b) Mosso C. "Tecniche convenzionali di valutazione analitica dell'igiene ambientale" in Atti Conferenza Nazionale " La valutazione degli interventi di sanificazione nell'industria alimentare" - Oxoid - 1998, pagg. 45-56
- c) Palliola E., Piccinnino G. " Criteri di campionamento, prelievo e trasporto per il controllo di qualità dei prodotti alimentari per l'analisi di laboratorio di liquidi biologici e deiezioni di origine animale ". Rapporti ISTISAN 88/35, 1988.
- d) Casati G. "Il controllo microbiologico, chimico e biochimico delle superfici" International pbi – Milano
- e) Guidi E. (2003) "Export USA:Listeria monogytogenes nei prosciutti crudi stagionati, rischio o pericolo per il nostro sistema?". Eurocarni, 18 (2), 135-141
- f) "The manual of sampling instruments" International pbi – Milano
- g) Ligugnana R. "Prelievo di campioni da recipienti, bidoni, cisterne, fusti"
- h) B. Ripamonti, L. Marossi, C. Cantoni, F. Colombo, B. Mantecca, S. Stella. "Confronto con i metodi di prelievo mediante tampone e mediante sponge nella valutazione dello stato igienico delle superfici di lavorazione nel settore delle carni". Ingegneria Alimentare 1/2002, 19-24
- i) AUSL Città di Bologna, ARPA Sez. di Bologna - Campionamento e Standard di Riferimento nell'ambito della Verifica del Piano di Autocontrollo Aziendale (D.Lgs. 155/1997) - 2001

SOMMARIO

CONSIDERAZIONI SUL CAMPIONAMENTO	3
RIFERIMENTI NORMATIVI.....	3
CAMPIONAMENTO MICROBIOLOGICO	4
CAMPIONAMENTO MICROBIOLOGICO DI ALIMENTI	4
1. DEFINIZIONE DI UN PIANO DI CAMPIONAMENTO.....	4
2. FORMAZIONE DEL CAMPIONE.....	4
2.a. modalità di frazionamento.....	4
2.b. quantità di materiale da prelevare.....	10
2.c. numero di aliquote o U.C. da prelevare.....	10
3. CONFEZIONAMENTO.....	11
Caratteristiche del contenitore ideale.....	11
Requisiti per il confezionamento del campione ufficiale.....	12
4. COMPILAZIONE DEL D.A. = VERBALE DI PRELIEVO.....	12
informazioni da riportare nel verbale o d.a.....	12
leggibilità.....	12
sistemazione d.a.....	12
requisiti per la redazione del verbale in caso di campione ufficiale.....	12
5. TRASPORTO AL LABORATORIO.....	13
temperature.....	13
contenitori.....	13
tempi.....	13
CAMPIONAMENTO MICROBIOLOGICO DI SUPERFICI	13
SUPERFICI CAMPIONABILI.....	14
Superfici biotiche:.....	14
Superfici abiotiche:.....	14
DETERMINAZIONI BATTERIOLOGICHE.....	14
Determinazioni quantitative.....	14
Determinazioni qualitative.....	14
METODICHE DISPONIBILI.....	14
PRELIEVO MEDIANTE TAMPONE.....	15
Materiale necessario:.....	15
Determinazioni effettuabili:.....	15
Tecnica di prelievo (Ricerche quantitative).....	15
Tecnica di prelievo (Ricerche qualitative).....	16
PRELIEVO MEDIANTE SPUGNETTA.....	16
Materiale necessario:.....	16
Determinazioni effettuabili:.....	17
Tecnica di prelievo (Ricerche quantitative):.....	17
Tecnica di prelievo (Ricerche qualitative).....	17
Aspetti positivi delle metodiche di prelievo con tampone o spugna: si possono:.....	18
Aspetti negativi delle metodiche di prelievo con tampone o spugna:.....	18
PRELIEVO MEDIANTE PIASTRE A CONTATTO.....	18
Materiale necessario.....	18
Determinazioni effettuabili:.....	18
Tecnica di prelievo.....	18
Aspetti Positivi delle metodiche di prelievo con piastre RODAC o sistemi analoghi:.....	19
Aspetti negativi delle metodiche di prelievo con piastre RODAC o sistemi analoghi:.....	19
INATTIVAZIONE RESIDUI DI DISINFETTANTI.....	19
INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI	20
GLOSSARIO	29
BIBLIOGRAFIA	29