



Linee guida per l'esecuzione del prelievo da parte del cliente

**Allegato 1
PG.03
Rev. 2
Pag. 1 di 7**

REGISTRAZIONE DELLE VARIAZIONI E MODIFICHE

<i>Rev.</i>	<i>Data</i>	<i>Modifiche apportate</i>
0	10/01/2011	Prima emissione
1	30/10/2012	Inserite le modalità di prelievo per le acque e per i tamponi superficiali
2	13/12/2013	Modificato par. 2

FIRME PER APPROVAZIONE

<i>Redatta da</i>	<i>Verificata da</i>	<i>Approvata ed emessa da</i>
Nome	Nome	Nome
Firma	Firma	Firma



1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente procedura definisce le modalità di prelievo degli alimenti, delle acque e di tamponi superficiali per le analisi microbiologiche, intese come istruzioni da dare al Cliente da parte del personale addetto all'accettazione dei campioni.

2. RIFERIMENTI

UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005

Rapporti ISTISAN 96/35 pag. 9 (analisi microbiologiche)

DM 26/03/92 pag. 10 (latte)

D.M. 21/04/86 – metodi di analisi per i formaggi

ISO 7218:2013

Rapporti ISTISAN 00/14 Pt.2 per le analisi microbiologiche

Rapporti ISTISAN: 07/5 - Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi microbiologici

ISO 18593:2004 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs

3. MODALITÀ OPERATIVE

ALIMENTI

- Il campionamento deve essere sempre rappresentativo dell'intera partita che si intende controllare;
- Il campione deve essere sempre rappresentativo del prodotto che si intende analizzare e non unicamente di una sua porzione (parte centrale, parte superficiale ecc...)
- La cadenza dei campionamenti deve rispondere ad un preciso programma messo a punto con la collaborazione del responsabile della qualità dell'azienda committente e comunque nel rispetto delle norme vigenti;
- L'area di campionamento deve essere il più possibile priva di fattori di rischio di contaminazioni crociate: correnti d'aria, sporcizia, materiale contaminato e/o contaminante, animali liberi;
- Per il campionamento di sostanze solide utilizzare ferri sterili e/o sterilizzabili sul momento mediante fiamma, contenitori o buste sterili;
- Per il campionamento di sostanze liquide utilizzare sistemi sterilizzabili al momento o usufruire, se presente, di un rubinetto di campionamento preferibilmente in metallo tale da poter essere sterilizzato con fiamma al momento. Se si usano rubinetti o altri punti di uscita far scorrere il campione per un tempo tale da garantire che l'aliquota campionata sia rappresentativa del campione. Per grandi quantità contenute in serbatoi soggetti a



svuotamento, è consigliabile prelevare il campione in tempi successivi, cosicché il campione sia costituito da aliquote rappresentative dell'intera massa;

- Il campionamento per l'analisi microbiologica deve essere fatto sempre sterilmente:
 - usare cioè contenitori in vetro o plastici sterili, strumenti da campionamento sterili,
 - ridurre al minimo i passaggi, o sanificare sempre tutto ciò che nelle immediate vicinanze può contaminare il campione (superfici, contenitori, rubinetti) mediante fiamma la dove sia possibile, o alcool denaturato;
 - porsi sempre in luoghi il più possibile al riparo da correnti d'aria.
- I campionamenti di superfici per l'analisi microbiologica devono essere fatti strisciando tamponi sterili sulle superfici da campionare (per una superficie di 100cm² strisciare su un'area di 10x10 cm). Il cliente deve indicare la superficie rappresentata dal campione.
- I campioni devono presentare un'identificazione univoca e leggibile, per più campioni il cliente può indicare l'elenco in un foglio, fermo restando che il campione deve essere univocamente identificato mediante codice o altra indicazione;
- Porre immediatamente i campioni in borsa refrigerata/coibentata e trasportare in sede di analisi: al ricevimento del campione dovranno essere rispettate in laboratorio le seguenti temperature

Tipo di materiale	Temperatura alla consegna
Carni	+ 2/+ 7°C
Pesce	+ 2/+ 10°C
Pollame	+ 2/+ 7°C
Uova	< 20°C
Prodotti a base di uovo	+ 2/+ 7°C
Latte pastorizzato	1° / 6°C
Latticini freschi	+ 0/+ 4°C
Formaggi	+ 2/+ 7°C
Burro e burro anidro	+ 2/+ 7°C
Alimenti surgelati	< - 18 °C
Gelati alla frutta	- 7/- 10 °C
Altri gelati	- 10/-15°C
Prodotti congelati	- 7/- 10 °C
Cibi deperibili ricoperti o farciti con panne o creme a base di uovo – frutta e latte, prodotti di gastronomia con o senza copertura di gelatina alimentare. Alimenti deperibili cotti da conservarsi freddi (arrosti - paste alimentari fresche con ripieno) o manipolati dopo cottura	+ 0/+ 4°C
Ortofrutta	+ 0/+ 4°C
Salumi stagionati	+ 2/+ 7°C
Alimenti non deperibili a temperatura ambiente	< 30 °C



Campionamento rappresentativo di un lotto o partita

- Se si tratta di campioni solidi, il numero delle unità campionarie non deve mai essere inferiore a 5 da 100 g l'una, e sempre rappresentativo dell'intero lotto.
- Se si tratta di acque e/o bevande bisogna campionare una quantità non inferiore a 2 litri in bottiglie di vetro sterili (1 litro in bottiglia chiara e 1 litro bottiglia scura).
- Se si tratta di prodotti liquidi si prelevano 5 unità da 500 ml l'una. Se il campione è contenuto in piccole confezioni per la vendita al minuto, bisogna prendere direttamente cinque di queste confezioni evitando così passaggi e manipolazioni inutili.

Campionamento per analisi non rappresentative

Se il cliente non richiede alcun carattere di ufficialità e/o rappresentatività del campione sottoposto ad analisi, preleverà il campione nelle seguenti quantità minime:

- 150 – 200 g / 100 - 150 ml

ACQUE

Regole per il prelievo

Il prelievo dei campioni microbiologici deve essere effettuato con:

- Bottiglie sterili monouso in materiale plastico o in vetro Pyrex. Nel caso di acque destinate al consumo umano, che sono spesso disinfettate e contengono cloro, le bottiglie sterili che vengono utilizzate sono acquistate già pronte e dotate di tiosolfato al 10% (1ml per litro), per inibire l'azione del disinfettante. Per la raccolta di campioni da analizzare non possono essere usati contenitori metallici;
- Flambatore per la sterilizzazione della bocca di uscita del getto da campionare dove possibile;
- Etichetta per identificare il campione e pennarello indelebile

Quantità da prelevare

Al momento del campionamento è necessario considerare con attenzione i volumi di acqua da prelevare. Essi vanno definiti in funzione dei parametri da determinare e comunque devono essere superiori al minimo necessario per procedere allo svolgimento degli esami richiesti.

Nella tabella sotto sono riportate le quantità di campione a seconda del parametro ricercato:

Parametro	Quantità (mL)
Enterococchi	150
Escherichia Coli	150
Coliformi a 37 °C	150

Prelievo da rubinetto

- 1) Asportare, se presenti, tubi o guarnizioni in plastica e gomma;



- 2) Flambare la bocca del rubinetto solo su rubinetti metallici;
- 3) Aprire il rubinetto e lasciare scorrere l'acqua per 1 – 3 minuti;
- 4) Al momento del prelievo aprire la bottiglia sterile avendo cura di non toccare la parte interna del tappo che andrà a contatto con il campione prelevato, nè l'interno del collo della bottiglia, ;
- 5) Effettuare il prelievo evitando di modificare il flusso del rubinetto durante questa operazione e senza effettuare risciacqui;
- 6) Evitare di riempire completamente la bottiglia al fine di consentire una efficace omogeneizzazione del campione al momento dell'analisi;
- 7) Chiudere immediatamente il tappo della bottiglia ed identificare il campione dati del campione necessari (Tipo di acqua (natura del campione); Data e ora del campionamento; Luogo e punto di campionamento).
- 8) disporre la stessa momentaneamente in un frigo portatile dotato di siberini
- 9) campioni devono essere trasportati in laboratorio al più presto: vi devono giungere idealmente entro le 18 ore, comunque non oltre le 24 ore dal prelievo

Prelievo da piscina o pozzo

- 1)Utilizzare bottiglie sterili incartate prima della sterilizzazione in modo da non contaminare l'acqua da prelevare;
- 2) Utilizzando una pinza o un altro sistema idoneo (anch'esso sterilizzato e incartato fino al momento del prelievo), calarla nel pozzo;
- 3) Immergerla completamente e lasciare che si riempia;
- 4) tirarla fuori, scartare i primi 2- 3 cm di acqua per creare una efficace omogeneizzazione del campione al momento dell'analisi;
- 5) Chiudere immediatamente il tappo della bottiglia ed identificare il campione o con i dati del campione necessari (Tipo di acqua (natura del campione); Data e ora del campionamento; Luogo e punto di campionamento);
- 6) disporre la stessa, momentaneamente, in un frigo portatile dotato di siberini;
- 7) i campioni devono essere trasportati in laboratorio al più presto: vi devono giungere idealmente entro le 18 ore, comunque non oltre le 24 ore dal prelievo

TAMPONI SUPERFICIALI

Regole generali

E' importante che il laboratorio riceva un campione che sia rappresentativo della superficie testata e che non sia stato cambiato durante il trasporto e lo stoccaggio oppure da residui di disinfettanti. I disinfettanti sono generalmente formulati per una disinfezione il cui tempo di contatto va da 5 a 15 minuti. Attendere per un periodo di tempo in accordo con le indicazioni sul disinfettante prima di analizzare la superficie con tamponi o dischi da contatto, per valutare l'efficacia del programma di pulizia e disinfezione (o altrimenti secondo le indicazioni sul disinfettante).



Non può essere prescritto un neutralizzatore appropriato per tutte le situazioni. Generalmente, **sorbitano monooleato** (30 g/l) e la lecitina (3 g/l) sono utili per neutralizzare i residui di disinfettanti assorbiti (es. composti quaternari dell'ammonio, anfoteri). Il sodio tiosolfato (5 g/l) è un buon neutralizzatore per i prodotti alogenati. Nel caso di disinfettanti perossidati, può essere usata come neutralizzatore la catalasi e la perossidasi. Una unità di questi enzimi catalizza la decomposizione di una μmol di perossido di idrogeno al minuto a 25°C e a $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$. Un numero di neutralizzatori disinfettanti sono raccomandati in EN 1276, EN 1650, EN 13697e EN 13704.

I componenti di un neutralizzatore che può essere usato nella maggior parte delle situazioni sono espressi nella seguente tabella.

Preparare una soluzione di peptone (1g/l) e di cloruro di sodio (8,5 g/l), distribuire in provette o bottiglie e sterilizzare per 15 minuti a 121°C .

Componente	Concentrazione
Sorbitano monooleato (Polysorbato 80)	30 g/L
Lecitina	3 g/L
Tiosolfato di sodio	5 g/L
L- Istidina	1 g/L
Saponina	30 g/L

Metodo con piastra da contatto

Dopo averlo rimosso dai contenitori di trasporto, premere la superficie di agar della piastra da contatto o il DIPSLIDE con la mano ferma e senza movimenti laterali contro la superficie di analisi. Dalla letteratura è noto che i risultati ottimali per le piastre da contatto si ottengono con un tempo di contatto di 10 secondi e una pressione ottenuta con una massa di 500 g. Chiudere le piastre o i DIPSLIDE immediatamente dopo l'inoculazione e rimmetterli in un contenitore da trasporto.

Metodo del tampone

Rimuovere un tampone dal terreno di trasporto sterile e inumidire la punta immergendolo in una provetta contenente il liquido di diluizione. Premere la punta del tampone contro le pareti della provetta per rimuovere l'acqua in eccesso. Porre la punta del tampone sulla superficie da analizzare e strisciare un'area stimata da circa 20 a 100 cm^2 ruotando il tampone tra il pollice e l'indice in due direzioni perpendicolarmente l'una all'altra.

Mettere il tampone in una provetta con il liquido di diluizione e asetticamente rompere o tagliare lo stick.

Metodo del panno /spugna

Aprire la borsa di plastica o il contenitore con il panno o la spugna.

Rimuovere asetticamente il panno o la spugna con pinze sterili o con la mano con un guanto sterile.

Inumidire il panno o la spugna con una quantità sufficiente di diluente (senza eccedere). Nel caso di superfici umide, questo non è necessario.



**Linee guida per l'esecuzione del prelievo da parte
del cliente**

**Allegato 1
PG.03
Rev. 2
Pag. 7 di 7**

Rimettere il panno o la spugna nel sacco di plastica e chiuderlo in modo che non avvenga alcuna perdita.

Campionare la superficie scelta in due direzioni perpendicolari, cambiando la faccia del panno o della spugna. Posizionarli in contenitori sterili, aggiungere il diluente e chiudere. Aggiungere un volume sufficiente e noto di diluente, cosicché sia il panno che la spugna siano ancora umidi al momento delle analisi.

In alternativa, aprire la borsa di plastica contenente il panno o la spugna. Prendendo la spugna dal sacchetto, tirare il sacchetto invertito dalla mano. Usare la spugna per raccogliere il campione come descritto sopra e trasferire il panno o la spugna in un sacchetto di plastica sterile. Chiudere il sacchetto in modo che non avvenga alcuna perdita.

Trasporto

Trasportare i campioni prelevati con il tampone, preferibilmente nell'arco di 4 ore, e conservarli ad una temperatura tra 1° C a 4° C. I tamponi devono essere analizzati il prima possibile e comunque non più tardi delle 24 ore successive.