

PG 5.7/1	PROCEDURA GESTIONALE CAMPIONAMENTO punto 7.3 CAMPIONAMENTO MICROBIOLOGICO DI SUPERFICI	 ChemiLab
M 5.7/1/3		

LINEE GUIDA PER UNA CORRETTA ESECUZIONE DEI CAMPIONAMENTI SU SUPERFICI PER ANALISI MICROBIOLOGICHE:

Introduzione

Il campionamento ha lo scopo di valutare i livelli di contaminazione microbica delle superfici negli ambienti della catena alimentare, al fine di implementare azioni correttive volte ad evitare la contaminazione microbica degli alimenti. Programmi o tecniche di campionamento inefficaci possono portare alla mancata rilevazione dei microrganismi, se presenti.

Questa procedura fornisce raccomandazioni sui luoghi e le aree da sottoporre a campionamento e sulla tempistica migliore per il campionamento stesso.

In base all'attrezzatura e al microrganismo da ricercare o numerare, la determinazione della contaminazione microbica superficiale viene condotta tramite campionamento della superficie e analisi secondo specifici standard.

Le superfici campionabili sono di tipo abiotico.

La responsabilità del campionamento effettuato dal cliente o da terzi è a loro carico, tali informazioni vengono fornite in sede di incarico da parte del personale che effettuerà i campionamenti e dovranno essere il più esaustive possibile in fase di accettazione (natura della superficie, tipologia di campionamento se in fase di lavorazione o meno...).

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).

Metodiche disponibili

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.

PG 5.7/1	PROCEDURA GESTIONALE CAMPIONAMENTO punto 7.3 CAMPIONAMENTO MICROBIOLOGICO DI SUPERFICI	 ChemiLab
M 5.7/1/3		

CAMPIONAMENTO MEDIANTE TAMPONE

Materiale necessario:

- Tamponi in fibra (rayon, dacron) o in alginato di calcio. Esistono in commercio dei tamponi per prelievi ambientali
- Delimitatori di superficie sterili monouso o riutilizzabili
- Sacchetti sterili
- Guanti monouso
- Frigorifero per trasporto
- Tamponi in fibra (rayon, dacron) o in alginato di calcio con appropriato liquido di trasporto o liquido neutralizzante. Esistono in commercio dei tamponi per prelievi ambientali: **per superfici sanificate deve essere utilizzato tampone con "Liquido neutralizzante"**- In generale, la base per il liquido neutralizzante è l'acqua peptonata, o il sale peptonato, o qualsiasi altro diluente appropriato (come quarter-strength della soluzione di Ringer, tampone fosfato a pH 7,5, soluzione peptonata a 1g/l). Il laboratorio acquista tamponi: COPAN SRK con liquido neutralizzante SRK solution: Sali: Sodio Cloruro, Potassio Cloruro, Calcio Cloruro, Sodio Bicarbonato, Sodio Fosfato Bibasico, Potassio Fosfato Monobasico Componenti neutralizzanti: Tween 80, Lecitina, Sodio Tiosolfato, Sodio Tioglicolato Componenti rivitalizzanti: Sodio Piruvato, Acqua Distillata. Le componenti risultano previste al punto 5.3 della ISO 18593:2018 per i casi di superfici appena sanificate).

In caso di superfici non sanificate (durante le operazioni di manipolazione degli alimenti) possono essere utilizzati come base buffered peptone water, Soluzione di peptone sale (mrd), o altri appropriati diluenti (quarter-strength Ringer's solution, phosphate buffer at pH 7,5, peptone solution at 1 g/l), come indicato al punto 5.1 della Iso 18593: 2018.

Il liquido neutralizzante serve per evitare l'effetto inibitorio del disinfettante utilizzato.

- Provetta di plastica con tappo "a tenuta"
- Liquido diluente
- "Delimitatore di area" sterile
- Verbale o Documento di Accompagnamento unitamente alla Richiesta di analisi
- **"Ricerca Salmonella spp"** prevede utilizzo di tamponi con brodo di arricchimento primario: Buffered Peptone Water che possono essere acquistati pronti oppure riempiendo tamponi sterili vuoti con 10 ml di BPW preparata in laboratorio, secondo quanto previsto dalla ISO 18593:2018 (esclusi punti 7 e 8) + UNI EN ISO 6579:2017 (escluso punto 9.5.6)
- **"Ricerca Listeria monocytogenes"** prevede utilizzo di tamponi con Brodo di arricchimento primario: One Broth Listeria ottenuti riempiendo tamponi sterili vuoti con 10 ml di BPW preparata in laboratorio, secondo quanto previsto dalla ISO 18593:2018 (esclusi punti 7 e 8) + AFNOR UNI 03/04-04/05 (conferma AFNOR UNI 03/04-04/05 opzione 2).

PG 5.7/1	PROCEDURA GESTIONALE CAMPIONAMENTO punto 7.3 CAMPIONAMENTO MICROBIOLOGICO DI SUPERFICI	 ChemiLab
M 5.7/1/3		

Tecnica di prelievo

Generale

I luoghi e le aree da sottoporre a campionamento, le tempistiche e le tecniche dovrebbero essere selezionati in base al rischio, e dovrebbero indirizzarsi verso le superfici con più alta probabilità di rilevare contaminazioni durante la lavorazione degli alimenti, sia nel caso si monitori il livello di igiene di specifiche fasi produttive o l'intero processo. È opportuno mantenere sempre la stessa modalità operativa per campionamenti di routine in modo da permettere la valutazione dell'andamento dei dati.

Punti di campionamento

I microrganismi sono presenti su superfici visivamente pulite, ma più frequentemente si ritrovano in luoghi umidi e sporchi in cui i batteri possono crescere e persistere. Punti difficili da raggiungere, quali fori o fessure in attrezzature fibrose, porose o difficili da pulire, materiali cavi e soggetti a ruggine, sono potenziali siti di contaminazione che andrebbero campionati. Può risultare difficile raggiungere particolari punti in cui si può depositare del cibo; in tal caso potrebbe essere necessario smontare l'apparecchiatura. La scelta del punto di campionamento deve essere fatta in base allo storico dei dati relativi ad ognuno dei punti possibili e in seguito all'esame di ogni fase dell'intero processo.

Di seguito si indicano esempi di potenziali punti di campionamento:

- Superfici non a contatto con gli alimenti: tubature di scarico, pavimenti, pozzetti per lo scarico dell'acqua su pavimento, attrezzi per la pulizia, aree di lavaggio, bilance da pavimento, tubi di gomma, cilindri cavi per i trasporti, trasportatori, struttura delle attrezzature, pannelli interni delle attrezzature, vasche di raccolta condensa, carrelli elevatori, carrelli a mano, carrelli merci, ruote dei carrelli, secchi dell'immondizia, congelatori, macchine per la produzione del ghiaccio, ventole di raffreddamento di condensatori, grembiuli, pareti, soffitti, punti freddi in cui l'acqua si condensa, isolamento umido nelle pareti o intorno alle tubature, unità refrigeranti, guarnizioni di gomma di porte (specialmente nei frigoriferi), aspirapolveri, maniglie di porte e rubinetti.
- Superfici a contatto con alimenti: nastri trasportatori, affettatrici, taglieri, cubettatrici, tramogge, sminuzzatori, frullatori, pelapatate, macchine di assemblaggio, attrezzature di farcitura e confezionamento, contenitori, altri utensili, guanti e mani.

Area di campionamento

Identificare una specifica area della superficie da analizzare. Il campione deve essere rappresentativo della superficie testata e non deve aver subito modifiche durante il campionamento e trasporto o a causa di residui di disinfettanti. L'area in oggetto può non sempre essere definita numericamente; in tal caso riportare una descrizione chiara dell'area di campionamento. Se, al contrario, l'area è definita da un numero, seguire quanto riportato successivamente. Per quanto riguarda l'identificazione (presenza/assenza) di microrganismi su superfici accessibili, l'area totale del campionamento deve essere la più ampia possibile per incrementare la probabilità di ritrovamento del microrganismo. A tal proposito, si raccomanda, quando possibile, di campionare un'area compresa tra 1000 e 3000 cm² (cioè tra 0,1 e 0,3 m²). In caso di campionamento per la

PG 5.7/1	PROCEDURA GESTIONALE CAMPIONAMENTO punto 7.3 CAMPIONAMENTO MICROBIOLOGICO DI SUPERFICI	 ChemiLab
M 5.7/1/3		

numerazione di microrganismi, l'area non deve essere necessariamente così ampia ma può essere ad es. $\leq 100 \text{ cm}^2$.

Tempistica di campionamento e frequenza

Il campionamento può essere eseguito durante/dopo la produzione oppure in seguito a pulizia e disinfezione. La tempistica di campionamento deve essere specificata nel piano di campionamento di ciascun produttore, in base agli scopi del campionamento stesso. La rilevazione di certi microrganismi può risultare difficile se i campioni sono prelevati immediatamente o poco dopo la pulizia e disinfezione; le cellule potrebbero essere ancora vitali ma non coltivabili, come conseguenza del danno causato dagli agenti chimici impiegati nella disinfezione, pertanto la loro presenza potrebbe non essere facilmente osservabile. Per incrementare la probabilità di individuare tali germi, il campionamento dovrebbe essere effettuato durante il processo produttivo (dopo almeno 2 ore dall'inizio della produzione oppure al termine delle sessioni di produzione cioè prima delle operazioni di pulizia e disinfezione). Se il campionamento non viene eseguito quotidianamente, non dovrebbe essere eseguito nel/negli stesso/i giorno/i della settimana. Può essere opportuno prelevare campioni di superficie in seguito a riparazioni della strumentazione, implementazione e incremento della capacità produttiva poiché questi fattori possono aumentare il rischio di contaminazione microbica. Il campionamento deve essere eseguito frequentemente nelle aree in cui l'alimento è esposto alla contaminazione; potrebbe essere comunque interessante campionare, con minore frequenza, le aree in cui non è esposto a contaminazioni (aree di stoccaggio).

Tecniche di campionamento

Per il campionamento di aree piccole difficili da raggiungere ($\leq 100 \text{ cm}^2$), utilizzare tamponi sterili. Per il campionamento di aree ampie ($> 100 \text{ cm}^2$), si utilizzano più tamponi di superficie ognuno per un'area da 100 cm^2 , se i clienti e le aziende da campionare lo permetteranno, si acquisteranno spugne sterili.

Il campionamento può essere eseguito con o senza l'utilizzo del delimitatore.

- prelievo con delimitatore: da utilizzare per superfici piane, sufficientemente ampie e lisce; l'area della superficie che deve essere esaminata viene identificata con un delimitatore sterile di superficie nota. L'area del delimitatore espressa in cm^2 , verrà riportata nel verbale di campionamento M5.7/1/1

- prelievo senza delimitatore: da utilizzare generalmente per superfici non piane o non sufficientemente ampie, sulle quali non è possibile l'uso del delimitatore. La superficie campionata dovrà essere rappresentativa dell'utensile. Il prelievo farà riferimento al tampone/spugna e non alla superficie; tale informazione è riportata nel Verbale di campionamento M 5.7/1/1. Dopo il campionamento, se necessario, la superficie va pulita e/o disinfettata, per evitare che tracce di nutrienti, umidità, elementi fisici e chimici derivanti dal campionamento stesso rimangano sulla superficie campionata. A tal scopo si possono utilizzare salviette sterili inumidite con alcol.

PG 5.7/1	PROCEDURA GESTIONALE CAMPIONAMENTO punto 7.3 CAMPIONAMENTO MICROBIOLOGICO DI SUPERFICI	 ChemiLab
M 5.7/1/3		

Metodo con tampone

I tamponi sterili andrebbero utilizzati per il campionamento di aree piccole ($\leq 100 \text{ cm}^2$), difficili da raggiungere (ad es. cilindri cavi o alloggiamenti di motori). Si raccomanda l'utilizzo di un delimitatore per evitare il trasferimento di contaminanti e/o composti disinfettanti. L'ampiezza dell'area campionata deve essere nota e il punto di prelievo ben descritto.

Nel caso in cui l'area da campionare sia umida, si può utilizzare un tampone a secco, a meno che non siano necessari neutralizzanti.

Nel caso in cui l'area sia asciutta si può utilizzare un tampone umido.

- Rimuovere il tampone dalla confezione sterile.
 - Nel caso di utilizzo del tampone secco (quindi superficie umida) campionare la superficie da esaminare.
 - In caso di tampone umido (o tampone secco da inumidire con diluente) (quindi superficie asciutta), inumidire la parte di cotone del tampone immergendolo in una provetta contenente il diluente/neutralizzante. In particolare considerare l'SPS-neutralizzante per superfici sanificate, Premere il cotone del tampone contro la parete della provetta per rimuovere l'eccesso di liquido.
 - Appoggiare la punta del tampone asciutto o inumidito sulla superficie da analizzare e strofinare un'area stimata ad es. $\leq 100 \text{ cm}^2$ ruotando il tampone tra il pollice e l'indice in due direzioni tra loro perpendicolari.
 - Per superfici piatte il campionamento va eseguito orizzontalmente e verticalmente, ad es. 10 volte in ciascuna direzione.
 - Per piccole superfici difficili da raggiungere assicurarsi di effettuare il prelievo sull'intero punto di campionamento, incluso fessure, aperture, punti di connessione, ecc.
 - Riporre il tampone nella provetta vuota (tampone a secco) o contenente il diluente/neutralizzante (tampone umido) e rompere l'asta in modo asettico (è possibile utilizzare forbici sterili).
 - Infine richiudere la provetta e assicurarsi che resti chiusa (e che mantenga l'umidità del tampone, se è il caso) fino all'analisi.
 - Indentificare in modo univoco la provetta.
- E' importante che il laboratorio riceva un campione che sia rappresentativo della superficie testata e che non sia stato contaminato durante il trasporto e lo stoccaggio oppure da residui di disinfettanti.
 - 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 da $10 \times 10 \text{ cm}^2$ o comunque misurabile utilizzando la medesima maschera (ad esempio sovrapponendo due mascherine sterili per ridurre la superficie di prelievo).

PG 5.7/1	PROCEDURA GESTIONALE CAMPIONAMENTO punto 7.3 CAMPIONAMENTO MICROBIOLOGICO DI SUPERFICI	 ChemiLab
M 5.7/1/3		

- La dimensione della superficie di prelievo deve essere riportata nel documento che accompagna il campione (M5.7/1/1 Verbale di campionamento)
- 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 ed il risultato sarà espresso in UFC / tampone oppure Presenza /Assenza / tampone.
- Una volta delimitata l'area da campionare si inumidisce il tampone con il liquido contenuto 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 canea, 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
- Lo striscio va effettuato in successione lungo due direzioni tra loro perpendicolari. Per ogni tampone a disposizione effettuare il prelievo su superfici in continuo della stessa. Non si può campionare tre volte gli stessi 100 centimetri quadri pensando che il terzo prelievo possa rilevare la presenza di microrganismi che non siano stati già recuperati dal primo o dal secondo campionamento. Per cui superficie unica, oggetto unico, tamponi 3 fare in modo di testarli tutti e tre in punti diversi altrimenti la prova stessa potrebbe non avere valore ai fini della ricerca di microrganismi altamente patogeni come la Salmonella spp o la Listeria monocytogenes.
- 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

PG 5.7/1	PROCEDURA GESTIONALE CAMPIONAMENTO punto 7.3 CAMPIONAMENTO MICROBIOLOGICO DI SUPERFICI	 ChemiLab
M 5.7/1/3		

CAMPIONAMENTO MEDIANTE PIASTRE A CONTATTO

Materiale necessario

- Si impiegano piastre dette a contatto
- Queste piastre hanno un diametro di 6.5 cm 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 quadrettato con quadrati per facilitare il conteggio

Tecnica di prelievo

Il prelievo si esegue appoggiando le piastre (estratte dal contenitore sterile di trasporto) sulle superfici di cui si vuole misurare la carica batterica o altri microrganismi come coliformi totali, ecc

Il prelievo si esegue appoggiando le piastre (estratte dal contenitore sterile di trasporto) 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

Dopo il prelievo le piastre vengono chiuse, se necessario trasportate a T controllata 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/16cm²

Un conteggio accurato può essere effettuato solo sulle piastre nelle quali non siano cresciute più di 00 colonie.

Se la rappresentatività del prelievo eseguito è scarsa per la piccola superficie esaminata bisogna aumentare il numero delle piastre utilizzate.

TEMPERATURE DI TRASPORTO IDONEE:

MATRICE	TEMPERATURE IDONEE DI TRASPORTO	RIFERIMENTO
Tamponi di superficie	1-8°C	ISO 18593:2018

Trasportare i campioni prelevati a 1° C a 8° C. Il tempo che intercorre tra il campionamento l'analisi deve essere il più breve possibile. I campioni devono essere analizzati preferibilmente entro 24 h dal campionamento; qualora ciò non sia possibile, al ricevimento in laboratorio i campioni devono essere mantenuti a 3°C ± 2°C per un massimo di 48 h dal campionamento.

PG 5.7/1	PROCEDURA GESTIONALE CAMPIONAMENTO punto 7.3 CAMPIONAMENTO MICROBIOLOGICO DI SUPERFICI	 ChemiLab
M 5.7/1/3		

**CRITERI VINCOLANTI L'ACCETTABILITA' DEI CAMPIONI DA SOTTOPORRE A
CRITERI MICROBIOLOGICI:**

- QUANTITA'**

La quantità richiesta varia a seconda del tipo di campione in esame, delle analisi da effettuare e delle modalità di campionamento.

TAMPONI DI SUPERFICIE:

PARAMETRI	QUANTITA' MINIMA DI CAMPIONE	CONTENITORE	NOTE
Parametri microbiologici (Salmonella spp e/o Listeria monocytogenes e/o batteriologico)	N°3 TAMPONI DI SUPERFICIE: uno per categoria contenuti: - SRK - BPW O MRD - BPW per Salmonella - ONE BROTH LISTERIA (per Listeria)	Utilizzo di tamponi forniti dal Laboratorio stesso secondo quanto indicato nella ISO 18593 ed in altre ISO di riferimento	Indicare la misura della superficie campionata

- INTEGRITA' E STERILITA'**

Per i campioni da sottoporre ad analisi microbiologiche il materiale utilizzato per il campionamento deve essere monouso sterile, tale criterio è fondamentale per l'accettabilità del campione. Per campioni eseguiti da personale del laboratorio, i materiali utilizzati sono conformi a questo prerequisito, per i campionamenti eseguiti da personale esterno (privati, consulenti, ecc), questi vengono invitati a richiedere il materiale fornito direttamente dal Laboratorio Chemilab e/o a procurarselo presso negozi specializzati. Il Laboratorio fornisce anche le linee guida per il corretto campionamento di tamponi, alimenti ed acque.

Qualora sia necessario effettuare il trasporto deve essere utilizzato un frigo portatile e la temperatura deve essere rispettata.

Trasportare i campioni prelevati a 1° C a 8° C. Il tempo che intercorre tra il campionamento l'analisi deve essere il più breve possibile. I campioni devono essere analizzati preferibilmente entro 24 h dal campionamento; qualora ciò non sia possibile, al ricevimento in laboratorio i campioni devono essere mantenuti a 3°C ± 2°C per un massimo di 48 h dal campionamento.