

1. Scopo e campo di applicazione

Questo documento contiene alcune indicazioni utili per i clienti che devono effettuare il campionamento di superfici per l'esecuzione di analisi microbiologiche.

Esso si applica alle seguenti matrici:

- tamponi e spugnette ambientali (prelevati da attrezzature e superfici di lavoro);
- tamponi e spugnette alimentari (prelevati da carcasse con metodo non distruttivo secondo il Regolamento CE n. 2073/2005 e successive modifiche);
- campioni di tessuto superficiale da carcassa (prelevati con metodo distruttivo secondo il Regolamento CE n. 2073/2005 e successive modifiche).

2. Documenti di riferimento

- Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari (G.U.C.E. L 338/1 del 22.12.05) e successive modifiche.
- Intesa, ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n. 131, tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e di Bolzano su "Linee guida relative all'applicazione del Regolamento CE della Commissione europea n. 2073 del 15 novembre 2005 che stabilisce i criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari".

3. Definizioni e acronimi utilizzati

- **Campioni alimentari prelevati con metodo distruttivo:** campioni di tessuto superficiale prelevati dalla carcassa campionata in macello secondo il Regolamento CE n. 2073/2005 e successive modifiche.
- **Campioni alimentari prelevati con metodo non distruttivo:** tamponi o spugnette che rappresentano una superficie complessiva di 400 cm² (200 cm² per gli ovicaprini) derivanti da più aree campione sulla medesima carcassa come previsto dal Regolamento CE n. 2073/2005 e successive modifiche.
- **Spugnette:** spugnette piatte rettangolari e umide, libere da sostanze antimicrobiche, usate generalmente per campionamenti di grandi superfici (≥100 cm²).
- **Tamponi:** bastoncini con cotone o materiale sintetico ad una estremità, liberi da sostanze antimicrobiche.

4. Descrizione delle attività e responsabilità

Il campionamento, la conservazione e il trasporto del campione ai laboratori dell'IZSVe sono a carico del cliente e si svolgono sotto la sua responsabilità.

Per aspetti contrattuali si rimanda alle Condizioni generali di contratto disponibili sul sito internet IZSVe.

4.1 Attrezzature/strumenti/accessori

- Diluente sterile (acqua peptonata tamponata) 10 ml;
- Carrello, tavolo o altro idoneo piano di appoggio;
- Delimitatore sterile (monouso o riutilizzabile e sterilizzato);
- Etanolo 70%;
- Flambatore portatile;
- Guanti sterili;
- Scala, pedana, o altra attrezzatura necessaria al fine di permettere di raggiungere tutti i siti della carcassa da sottoporre a campionamento;
- Strumenti sterili per eseguire il prelievo: forbici, pinze;
- Tamponi sterili e spugnette per prelievi microbiologici (privi di sostanze inibenti) e relativi contenitori da trasporto (provette, sacchetti sterili da stomacher...).

I delimitatori, i tamponi sterili e le spugnette con i relativi contenitori da trasporto possono essere forniti, **su richiesta**, dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, limitatamente alle attività di autocontrollo.

4.2 Indicazioni generali

Il prelievo dovrebbe essere eseguito dalla persona specificatamente incaricata e formata, così individuata nel manuale di autocontrollo dell'impresa, che dovrebbe includere una lista delle verifiche da condurre prima dell'esecuzione del campionamento quanto a:

- disponibilità e adeguatezza dei materiali e delle attrezzature necessari per la raccolta, la preparazione e l'invio dei campioni (sapone e disinfettante per le mani, un piano di appoggio adeguato, guanti sterili, delimitatore, soluzione tampone sterile in provette da trasporto, tamponi sterili per campionamento, spugnette, soluzione disinfettante o altri presidi per la disinfezione del delimitatore, etichette e quant'altro necessario per identificare il campione, ecc.);
- verifica della soluzione tampone sterile impiegata per la raccolta e la spedizione del campione per assenza di torbidità, flocculazioni, detriti o altre formazioni estranee;
- disponibilità del laboratorio a ricevere e analizzare i campioni nei tempi previsti (entro 24 ore massimo dal momento del prelievo, a condizione che il campione venga mantenuto refrigerato);
- per quanto riguarda le carcasse, procedura per garantire la scelta effettivamente casuale delle carcasse e delle mezzene da campionare (ogni carcassa e le due mezzene della carcassa devono avere la stessa probabilità di essere scelte. A tal fine, possono essere impiegate tavole dei numeri casuali, programmi informatici generatori di numeri casuali o qualsiasi altro metodo che assicuri la completa casualità della scelta).

Predisporre l'attrezzatura necessaria sul piano di lavoro, assicurandosi di non entrare in contatto con le superfici sterili prima di avere indossato i guanti.

Lavare e disinfettare le mani e asciugarle con carta a perdere prima di indossare i guanti stando attenti a non toccare la superficie esterna dei guanti.

Se del caso farsi aiutare da una terza persona che proceda all'apertura della busta dei guanti e delle altre attrezzature sterili senza entrare in contatto con il contenuto.

Assicurarsi che le maniche del camice o comunque gli indumenti non possano entrare in contatto al momento del prelievo e della sua preparazione con le superfici da campionare e/o con le attrezzature sterili.

4.3 Tamponi ambientali

4.3.1 Metodo per il campionamento di superfici ambientali mediante l'impiego di tamponi

4.3.1.1 Preparazione del prelievo

Inumidire il tampone in 10 ml di diluente sterile. Assicurarsi che il tampone sia adeguatamente imbevuto, senza che lo stesso presenti un eccesso di liquido.

4.3.1.1 Esecuzione del prelievo

Dopo avere identificato i siti di campionamento, delimitare l'area da sottoporre a prelievo. Possono essere impiegati delimitatori sterili monouso o reimpiegabili, in materiale lavabile e disinfettabile. In quest'ultimo caso, deve essere garantito che le procedure di disinfezione del delimitatore non influiscano sui risultati del campionamento (per esempio, nel caso in cui il delimitatore fosse stato immerso in una soluzione disinfettante, è necessario assicurare che la soluzione disinfettante non possa spandersi sull'area soggetta a campionamento – assicurare un tempo di contatto adeguato tra il disinfettante e il delimitatore). L'area compresa nel perimetro interno del delimitatore non deve venire a contatto con le mani dell'operatore né con alcun altro materiale diverso dal tampone per campionamento.

Strisciare il tampone su tutta l'area oggetto di prelievo esercitando una buona pressione e avendo cura di ruotare il tampone in modo che tutta la superficie del tampone stesso entri in contatto con la superficie da campionare. Il tampone dovrebbe essere strisciato sulla superficie da campionare orizzontalmente, verticalmente e in diagonale (circa 10 volte in ciascun senso). Il tampone non deve essere strofinato al di fuori

dell'area delimitata. Riporre quindi il tampone nella provetta contenente il diluente sterile, spezzando l'asta contro la parete del contenitore

Completate le attività di campionamento, riporre i tamponi nelle rispettive provette in un sacchetto di plastica sul quale sia stata apposta una etichetta identificativa del campione. Sigillare il sacchetto e predisporre per l'invio al laboratorio dopo avere verificato la corretta identificazione del campione.

4.3.2 Metodo per il campionamento di superfici ambientali mediante l'impiego di spugnette

4.3.2.1 Preparazione del prelievo

Preparare le spugnette aggiungendo nel sacchetto plastico tipo stomacher una quantità di diluente sterile sufficiente a inumidire la spugna senza che rimanga del liquido libero visibile al fondo del sacchetto (10 ml dovrebbe essere una quantità adeguata).

Massaggiare la spugna dall'esterno per essere certi che la stessa sia uniformemente inumidita, quindi, con adeguati movimenti dall'esterno, spingere la spugna verso l'apertura del sacchetto prima di aprire la busta plastica per estrarre la spugna, stando attenti a che la stessa non entri in contatto con le superfici esterne. La spugna deve essere estratta dalla busta plastica al momento del prelievo da parte dell'operatore addetto al campionamento.

Esistono in commercio spugnette già inumidite, pronte all'uso.

4.3.2.2 Esecuzione del prelievo

Dopo avere identificato i siti di campionamento, delimitare l'area da sottoporre a prelievo, che deve essere almeno di 100 cm², mediante l'impiego della maschera che delimiti un'area quadrata di 10 cm di lato.

Possono essere impiegati delimitatori sterili monouso o reimpiegabili, in materiale lavabile e disinfettabile. In quest'ultimo caso deve essere garantito che le procedure di disinfezione del delimitatore non influiscano sui risultati del campionamento (per esempio, nel caso in cui il delimitatore fosse stato immerso in una soluzione disinfettante, è necessario assicurare che la soluzione disinfettante non possa spandersi sull'area soggetta a campionamento – assicurare un tempo di contatto adeguato tra il disinfettante e il delimitatore).

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

Strofinare la spugna esercitando una buona pressione sull'area delimitata dalla maschera sia in senso orizzontale che verticale (circa 10 volte in un senso e 10 nell'altro). L'intera superficie racchiusa all'interno del delimitatore deve essere interessata dal campionamento. La spugna non deve essere strofinata al di fuori dell'area delimitata.

Completate le attività di campionamento, riporre la spugna nella busta di plastica. Sigillare il sacchetto e predisporre per l'invio al laboratorio dopo avere verificato la corretta identificazione del campione.

NOTA: Se si richiedono più determinazioni su una stessa superficie (es. analisi qualitative come ricerca di *Salmonella spp.* e ricerca di *Listeria monocytogenes*; e analisi quantitative ad es. conteggio della carica microbica totale, di *E. coli*, ecc): nel caso di campionamento mediante tamponi, è necessario conferire al laboratorio tamponi diversi, uno per l'analisi quantitativa e uno per ogni analisi qualitativa. Nel caso di campionamento mediante l'uso di spugnette, è necessario conferire al laboratorio una spugna per l'analisi quantitativa ed eventualmente per la ricerca di *Salmonella spp.* e una spugna dedicata alla sola ricerca di *Listeria monocytogenes*.

4.4 Tamponi alimentari (su carcassa)

4.4.1 Siti di prelievo

I quattro possibili siti di prelievo per carica batterica totale ed enterobatteriacee sono scelti tra quelli previsti per gli ungulati dalla norma ISO 17604. Tuttavia, anche per dare continuità alle interpretazioni dei risultati secondo quanto descritto nella Decisione 2001/471/CE, è consigliabile continuare ad effettuare i prelievi ne-

gli stessi punti di reperi precedentemente individuati e di seguito elencati, con la possibilità che l'operatore economico opti per altri siti tra quelli indicati nell'allegato A della norma ISO 17604:

- **bovini:** collo, punta di petto, pancia e scamone;
- **ovini e caprini:** pancia, costato, punta del petto e petto;
- **suini:** lombo, guancia, faccia mediale della coscia (prosciutto) e pancetta;
- **cavallo:** pancia, punta di petto, lombo, scamone.

In ogni caso, i siti di campionamento dovrebbero essere descritti nelle pertinenti procedure elaborate dall'operatore economico.

Qualora l'operatore del settore alimentare decida di utilizzare nuovi punti di reperi o abbia avviato l'attività dopo l'entrata in vigore del Regolamento 2073/2005, dovrebbe effettuare una validazione del sistema proposto.

4.4.2 Metodo non distruttivo

In caso di applicazione del metodo non distruttivo per la numerazione della carica batterica totale e delle enterobatteriacee, i metodi di prelievo sono:

- a) spugna abrasiva "sponge bag";
- b) tampone secco e umido.

Per la ricerca di *Salmonella spp.*, la metodica di campionamento è esclusivamente quella non distruttiva mediante l'utilizzo di spugna abrasiva (*sponge bag*). Ciascuna delle quattro aree di campionamento deve essere almeno di 100 cm² (50 cm² per gli ovicaprini).

Se il campione è costituito da spugna, è possibile effettuare, con la medesima spugna, sia la ricerca di *Salmonella spp.*, sia il conteggio della carica microbica totale e delle enterobatteriacee. È possibile utilizzare una sola spugna per carcassa sui quattro siti.

4.4.2.1 Metodo per il campionamento non distruttivo delle carcasse di ungulati mediante l'impiego di spugnette

4.4.2.1.1 Preparazione del prelievo

Preparare le spugnette aggiungendo nel sacchetto plastico tipo stomacher una quantità di diluente sterile sufficiente a inumidire la spugna senza che rimanga del liquido libero visibile al fondo del sacchetto (10 ml dovrebbe essere una quantità adeguata).

Massaggiare la spugna dall'esterno per essere certi che la stessa sia uniformemente inumidita, quindi, con adeguati movimenti dall'esterno, spingere la spugna verso l'apertura del sacchetto prima di aprire la busta plastica per estrarre la spugna, stando attenti a che la stessa non entri in contatto con le superfici esterne. La spugna deve essere estratta dalla busta plastica al momento del prelievo da parte dell'operatore addetto al campionamento.

Esistono in commercio spugnette già inumidite, pronte all'uso.

4.4.2.1.2 Esecuzione del prelievo

Dopo avere identificato i siti di campionamento, delimitare l'area di 100 cm² (50 cm² per le carcasse di ovicaprini) da sottoporre a prelievo mediante l'impiego della maschera che delimiti un'area quadrata di 10 cm di lato esercitando una pressione sufficiente a causare la procidenza del muscolo sottostante.

Possono essere impiegati delimitatori sterili monouso o reimpiegabili, in materiale lavabile e disinfettabile. In quest'ultimo caso, deve essere garantito che le procedure di disinfezione del delimitatore non influiscano sui risultati del campionamento (per esempio, nel caso in cui il delimitatore fosse stato immerso in una soluzione disinfettante, è necessario assicurare che la soluzione disinfettante non possa spandersi sull'area soggetta a campionamento – assicurare un tempo di contatto adeguato tra il disinfettante e il delimitatore). Se l'operatore impiega una scala, una pedana o un'altra attrezzatura per raggiungere le parti superiori della carcassa da campionare, è necessario che presti la massima attenzione affinché la superficie oggetto di cam-

pionamento non entri in contatto con tali attrezzature: l'area compresa nel perimetro interno del delimitatore non deve venire a contatto con le mani dell'operatore né con alcun altro materiale diverso dalla spugnetta per campionamento.

Strofinare la spugna esercitando una buona pressione (come se si dovesse detergere la superficie della carcassa da dei residui di sangue secco) sull'area delimitata dalla maschera, sia in senso orizzontale che verticale (circa 10 volte in un senso e 10 nell'altro). L'intera superficie racchiusa all'interno del delimitatore deve essere interessata dal campionamento.

La spugna non deve essere strofinata al di fuori dell'area delimitata. Se del caso, il delimitatore può essere parzialmente ruotato durante il prelievo con la spugna, in modo da farlo aderire in ogni punto alla superficie della carcassa ed essere certi che la superficie delimitata sia effettivamente di 100 cm² (50 cm² per le carcasse di ovicapri).

La spugna dovrebbe essere strofinata in successione su tutti i siti di campionamento identificati a partire da quello meno contaminato verso quello che si ritiene maggiormente contaminato. In linea di massima, si può stimare che la sequenza dei campionamenti può procedere dall'alto verso il basso della carcassa (dal quarto posteriore a quello anteriore).

Un assistente al prelievo può validamente aiutare nel contenere la mezzena durante il prelievo, purché non entri in contatto direttamente o indirettamente con le aree soggette a campionamento.

Completate le attività di campionamento, riporre la spugna nella busta di plastica. Sigillare il sacchetto e predisporre per l'invio al laboratorio dopo avere verificato la corretta identificazione del campione.

4.4.3 Metodo per il campionamento non distruttivo delle carcasse di ungulati mediante l'impiego di tamponi secchi e umidi

4.4.3.1 Preparazione del prelievo

Inumidire il primo tampone in 10 ml di diluente sterile. Assicurarsi che il tampone sia adeguatamente imbevuto senza che lo stesso presenti un eccesso di liquido.

4.4.3.2 Esecuzione del prelievo

Dopo avere identificato i siti di campionamento, delimitare la prima area di 100 cm² (50 cm² per le carcasse di ovicapri) da sottoporre a prelievo mediante l'impiego della maschera che delimiti un'area quadrata di 10 cm di lato esercitando una pressione sufficiente a causare la procidenza del muscolo sottostante.

Possono essere impiegati delimitatori sterili monouso o reimpiegabili, in materiale lavabile e disinfettabile. In quest'ultimo caso, deve essere garantito che le procedure di disinfezione del delimitatore non influiscano sui risultati del campionamento (per esempio, nel caso in cui il delimitatore fosse stato immerso in una soluzione disinfettante, è necessario assicurare che la soluzione disinfettante non possa spandersi sull'area soggetta a campionamento – assicurare un tempo di contatto adeguato tra il disinfettante e il delimitatore). Se l'operatore impiega una scala, una pedana o un'altra attrezzatura per raggiungere le parti superiori della carcassa da campionare, è necessario che presti la massima attenzione affinché la superficie oggetto di campionamento non entri in contatto con tali attrezzature: l'area compresa nel perimetro interno del delimitatore non deve venire a contatto con le mani dell'operatore né con alcun altro materiale diverso dalla spugnetta per campionamento.

Strisciare il tampone su tutta l'area oggetto di prelievo esercitando una buona pressione (come se si dovesse detergere la superficie della carcassa da dei residui di sangue secco) e avendo cura di ruotare il tampone in modo che tutta la superficie del tampone entri in contatto con la superficie da campionare. Il tampone dovrebbe essere strisciato sulla superficie da campionare orizzontalmente, verticalmente e in diagonale (circa 10 volte in ciascun senso). Il tampone non deve essere strofinato al di fuori dell'area delimitata. Se del caso, il delimitatore può essere parzialmente ruotato durante il prelievo in modo da farlo aderire in ogni punto alla superficie della carcassa ed essere certi che la superficie delimitata sia effettivamente di 100 cm² (50 cm² nel caso di ovicapri).

Riporre quindi il tampone nella provetta contenente il diluente sterile, spezzando il manico in legno contro la parte del contenitore. Ripetere l'operazione precedentemente descritta impiegando un tampone perfettamente asciutto (tampone secco), che deve essere strofinato sulla stessa superficie già sottoposta a campionamento con il tampone umido. Riporre anche il secondo tampone nella stessa provetta contenente il diluente nella quale è stata riposto il primo tampone.

Ripetere le operazioni di cui sopra per tutte le aree da campionare impiegando per ciascuna area un tampone inumidito e uno secco.

Completate le attività di campionamento, riporre i tamponi nelle rispettive provette in un sacchetto di plastica sul quale sia stata apposta una etichetta identificativa del campione. Sigillare il sacchetto e predisporre per l'invio al laboratorio dopo avere verificato la corretta identificazione del campione.

4.4.4 Metodo distruttivo

4.4.4.1 Carcasse di ungulati

Sulle carcasse di ungulati, il campionamento può essere eseguito solamente per la numerazione della carica batterica totale e delle enterobatteriacee.

I prelievi sono effettuati in quattro siti di ogni carcassa.

Si prelevano, con forbici e pinze sterili, quattro campioni di tessuto dello spessore di circa 2 mm e della superficie di circa 5 cm² ciascuno, che costituiscono un totale di 20 cm².

Immediatamente dopo il prelievo, il campione deve essere posto all'interno di sacchetti sterili.

Delimitatore, forbici, bisturi e pinze devono sempre essere puliti e sterilizzati dopo ogni prelievo secondo la seguente procedura:

- pulire gli strumenti con un panno di cotone imbevuto in etanolo al 70%;
- immergere gli strumenti in etanolo al 70%;
- flambare gli strumenti con un flambatore portatile oppure lasciare che l'etanolo evapori naturalmente;
- attendere che gli strumenti eventualmente si raffreddino prima di utilizzarli nuovamente.

E' consigliabile l'utilizzo di più delimitatori sterili per evitare perdite di tempo dovute alle operazioni di pulizia e sterilizzazione degli strumenti.

4.4.4.2 Carcasse di pollame

Il metodo distruttivo si utilizza per la ricerca di *Salmonella spp.*

In ogni sessione di campionamento, sono prelevate casualmente almeno 15 carcasse dopo raffreddamento. Da ciascuna carcassa, sono prelevati campioni di pelle di collo del peso di circa 10 g. In ogni occasione, i campioni di pelle di collo prelevati da tre carcasse sono aggregati prima di essere esaminati, in modo da formare 5 campioni finali di 25 g.

4.5 Trasporto al laboratorio

I campioni dovrebbero essere analizzati nel più breve tempo possibile dal momento del prelievo, preferibilmente entro le 24 ore.

Le temperature previste dalla norma ISO 7218 in merito al trasporto dei campioni sono:

- tamponi e spugnette ambientali e superficiali : 1°C – 4°C
- tamponi e spugnette da carcasse: 1°C – 8°C

E' importante conservare e trasportare il campione ad idonea temperatura, dato che questa è un parametro che può influenzare il risultato delle prove analitiche. Inoltre è opportuno munirsi di boccetta testimone, che consiste in un contenitore a tenuta, riempito con acqua, alcool, glicerolo o simili, da conservare unitamente ai campioni, che permette la rilevazione della temperatura tramite termometro a sonda tarato al momento del conferimento. Il personale IZSVe addetto all'accettazione infatti provvede a misurare e riportare la temperatura e/o lo stato fisico del campione (refrigerato, congelato, temperatura ambiente) sul rapporto di prova accompagnando dalla dicitura "Temperatura di ricevimento rilevata: ___ °C. Condizioni del campione al ricevimento: ___". La temperatura è un parametro che può influenzare i risultati delle prove analitiche".

I campioni non dovrebbero essere posti a contatto con le piastre eutettiche congelate (c.d. siberini) o con il ghiaccio impiegato per mantenere il campione alla temperatura prescritta durante il trasporto.

I campioni devono giungere al laboratorio accompagnati da un modulo contenente almeno i seguenti dati:

- dati identificativi dello stabilimento,
- descrizione della superficie campionata,
- indicazione precisa dell'area campionata in cmq,
- indicazione della modalità di prelievo: es. metodo distruttivo, spugnette, ecc.,
- indicazione della specie animale, nel caso di campionamento di carcasse,
- indicazione degli accertamenti richiesti,
- indicazione del responsabile del prelievo,
- data e ora del campionamento.

Le modalità di invio dei campioni al laboratorio devono prevenire la possibilità di versamento del liquido di trasporto durante il tragitto.

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

Il liquido di trasporto deve essere possibilmente nella quantità di 10 ml, poiché i conteggi delle cariche microbiche sono effettuati sulla base di questo preciso volume e sull'area della superficie campionata dichiarata dal cliente. Si chiede pertanto di prestare molta attenzione anche durante le fasi di campionamento, affinché non vi sia spandimento di liquido, nel qual caso si consiglia di ripetere l'operazione con un altro tampone.

Nota: la versione aggiornata della presente linea guida è quella disponibile on line:

https://www.izsvenezie.it/servizi/informazioni-general/#_campioni