



Istituto Zooprofilattico
Sperimentale
del Mezzogiorno

Analisi microbiologiche degli alimenti: corretta prassi di campionamento.

dott.ssa Francesca Di Prisco | dott.ssa Yolande T.R. Proroga



*Si ringrazia vivamente la Dott.ssa Marchio Melania
per la preziosa collaborazione offerta durante la
redazione e la verifica del presente elaborato.*

PORTICI, Febbraio 2010

In questi ultimi anni il settore alimentare è stato coinvolto in diverse crisi (BSE, diossina, influenza aviaria, ITX, ecc.) e ciò ha portato il tema della sicurezza alimentare al centro dell'attenzione generale.

La qualità e la sicurezza degli alimenti dipendono dagli sforzi di tutte le persone coinvolte nella complessa catena della produzione agricola, della lavorazione, del trasporto, della preparazione, della conservazione e del consumo. In base alla definizione sintetica dell'Unione Europea e dell'organizzazione mondiale della sanità, la sicurezza alimentare è una responsabilità condivisa, dal campo alla tavola.

Per mantenere la qualità e la sicurezza degli alimenti lungo l'intera filiera alimentare sono necessari da un lato procedure operative per garantire la salubrità dei cibi e, dall'altro, sistemi di monitoraggio per garantire che le operazioni vengano effettuate correttamente.

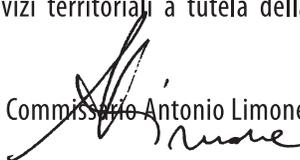
La strada da percorrere a tale scopo si snoda attraverso varie tappe:

- *l'applicazione di un nuovo quadro giuridico del settore alimentare che rifletta la politica "dal campo alla tavola" andando a coprire l'intera catena alimentare,*
- *l'applicazione di adeguate procedure per la valutazione del rischio sia da parte dell'OSA che dell'organo di controllo,*
- *l'attribuzione delle responsabilità della sicurezza alimentare ai produttori,*
- *l'attuazione di rapide ed efficaci misure di intervento di fronte ad emergenze sanitarie che si manifestano in qualsiasi punto della catena alimentare,*
- *l'esecuzione di appropriati controlli ufficiali,*
- *la necessità di garantire un'adeguata comunicazione ai consumatori, i quali devono essere tenuti adeguatamente informati sull'attività degli organismi istituzionalmente preposti all'assicurazione della salubrità degli alimenti, sulle nuove preoccupazioni in materia di sicurezza alimentare e sui rischi che certi alimenti possono presentare per determinati gruppi di persone.*

In questa ottica, considerando che la sicurezza alimentare è comunque un'emergenza permanente ed una vera sfida, visto che molteplici sono i fattori di rischio e le occasioni di contaminazioni, appare chiaro che l'obiettivo del manuale è quello di fornire ai veterinari ufficiali un'indicazione pratica per l'applicazione del nuovo quadro normativo europeo, cd Pacchetto igiene, relativamente alle corrette procedure di campionamento sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, Reg. 2073/2005.

Ringrazio gli autori del manuale che con la loro fatica hanno contribuito a realizzare la vera mission dell'Istituto Zooprofilattico che è quella di ottimizzare procedure e metodiche, integrandole con la collaborazione dei servizi territoriali a tutela della salute umana.

Il Commissario Antonio Limone



Analisi microbiologiche degli alimenti: corretta prassi di campionamento.

Premessa.

Il Regolamento (CE) della Commissione europea num. 2073/2005 del 15 novembre 2005 e successive modifiche (Reg. CE 1441/2007 del 5 dicembre 2007) entrato in vigore il 1° Gennaio 2006 in tutti gli stati membri dell'U.E. con l'obiettivo di elevare il livello di protezione della salute del consumatore, giunge finalmente ad aggiornare ed armonizzare i Criteri Microbiologici applicabili ai prodotti alimentari già contenuti nelle precedenti direttive comunitarie.

Con la sua applicazione molti dei precedenti criteri continuano a rimanere ancora validi, altri invece vengono modificati o eliminati lasciando spazio a nuovi criteri relativi ai prodotti alimentari e patogeni non compresi nelle precedenti normative comunitarie, quali ad esempio, frutta e vegetali pretagliati, latte in polvere per neonati, Salmonella spp. nelle carcasse, Listeria m. in alcuni prodotti pronti al consumo (RTE: ready to eat).

Relativamente ai criteri di processo per le carcasse di animale in fase di macellazione, quelli già previsti dalla Decisione 2001/471/CE abrogata dalla Direttiva 41/2004/CE recepita Decreto Legislativo

193/2007, vengono sostituiti da nuovi criteri.

Non va dimenticato che nel complesso del "Pacchetto igiene", i criteri microbiologici e chimici sono fissati anche dai Reg. (CE) n.853/2004 e Reg. (CE) n.854/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 Aprile 2004. Di seguito sono riassunti alcuni degli elementi che hanno costituito la base di partenza per questa importante opera di revisione:

- 1. I criteri microbiologici contenuti nelle direttive "verticali" sugli alimenti di origine animale erano stati elaborati diversi anni addietro e mai più aggiornati.*
- 2. Nella elaborazione degli stessi non si era tenuto conto della valutazione del rischio.*
- 3. La maggior parte dei criteri microbiologici non aveva una ricaduta significativa in termini di protezione della salute dei consumatori (es. numerazione Carica Batterica totale, numerazione Coliformi totali in alcuni prodotti alimentari).*
- 4. Le direttive non prevedevano linee guida per le azioni correttive da adottare in caso di risultati non soddisfacenti.*

5. *Scarsa utilità dei criteri microbiologici microbiologici del prodotto finito.*

6. *Inefficacia dell'esame microbiologico del prodotto finito per la garanzia di sicurezza di un alimento anche utilizzando un numero elevato di campioni caratterizzati da assenza di positività.*

Dai succitati elementi si osserva come una particolare enfasi venga attribuita all'utilizzo dei risultati delle analisi e alla valutazione del rischio per l'elaborazione dei criteri microbiologici al fine di associare quest'ultimi ad una effettiva riduzione del rischio di infezione umana.

Il Reg.(CE) 2073/05 si rivolge a tutti gli operatori del settore alimentare (OSA) che operano nelle diverse fasi della filiera quali lavorazione, preparazione, manipolazione comprendendo anche la fase della vendita al dettaglio e della distribuzione.

La sua lettura deve essere fatta tenendo in mente i concetti e l'approccio preventivo "dalla stalla alla forchetta" (**from farm to fork**) per la sicurezza degli alimenti relativi ai Regolamenti del "Pacchetto igiene".

Infatti il Reg. (CE) n. 2073/2005 prende in considerazione non solo i microrganismi ma assegna anche un ruolo determinante sia alle procedure di gestione della sicurezza quali **HACCP, GHP, GMP**, applicate ai diversi livelli della filiera, sia agli alimenti in sé introducendo per quest'ultimi alcuni fattori legati al tipo di substrato alimentare che condizionano lo sviluppo microbico.

Gli OSA in sostanza così come previsto dall' art. 4 commi (3)(4) del Reg. (CE) n. 852/04 che costituisce la base legale del Reg. (CE) n. 2073/05, devono rispettare i criteri microbiologici (ed adottare le azioni correttive in caso di non conformità) assicurando in particolare che:

1. *Le attività di manipolazione e lavorazione delle materie prime e dei prodotti alimentari siano svolte nel rispetto dei*

criteri di igiene del processo;

2. *I criteri di sicurezza alimentare che si applicano durante tutto il periodo di conservabilità o shelf life dei prodotti siano mantenuti se sono soddisfatte le condizioni previste per la fase di distribuzione e consumazione.*

3. *L'art. 14 del Reg. (CE) n. 178/02 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 28 Gennaio 2002 dispone che i prodotti alimentari non sicuri non possono essere immessi sul mercato.*

Il Reg.(CE) 2073/05 introduce 2 tipi di criteri: Criteri di Sicurezza Alimentari e Criteri di Igiene del Processo.

1. I Criteri di Sicurezza alimentare:

si basano sulla valutazione della sicurezza di un prodotto o partita di prodotto e ne definiscono l'accettabilità.

I relativi controlli riguardano gli alimenti già in commercio o pronti per la vendita, competono oltre che al produttore anche agli organi pubblici di controllo e rappresentano uno strumento di monitoraggio dell'efficacia dei sistemi di autocontrollo e di verifica della conformità dei prodotti agli standard di sicurezza stabiliti dai Regolamenti comunitari, in rapporto alle caratteristiche del prodotto, alle indicazioni riportate in etichetta ed all'uso abituale.

I parametri previsti sono:

- L.monocytogenes
- Salmonella spp.
- Enterotossine stafilococciche
- Enterobacter sakazakii
- E.coli
- Istamina

Essi vanno applicati ai prodotti ancora presenti nello stabilimento nella fase di fine processo e nelle fasi di distribuzione, nei punti vendita al dettaglio e/o all'ingrosso.

2. I Criteri di Igiene del Processo:

assicurano il funzionamento igienicamente accettabile del processo di produzione e rappresentano quindi uno strumento per la verifica e validazione delle procedure di autocontrollo.

Non si applicano ai prodotti immessi sul mercato, ma solo durante il processo di produzione, fissando un valore indicativo di contaminazione al di sopra del quale sono necessarie misure correttive volte a mantenere l'igiene del processo di produzione in ottemperanza alla legislazione in materia di prodotti alimentari.

I parametri previsti:

- Conteggio delle colonie aerobie
- Enterobacteriacee
- E.coli
- Salmonella spp.
- Stafilococchi coagulasi positivi
- B. cereus.

Verifica dei Criteri di Sicurezza Alimentare.

Tra le attività di controllo che competono all'ufficio veterinario responsabile per l'igiene degli alimenti di origine animale, sono comprese quelle relative alla sicurezza alimentare codificata dal Reg.(CE) 2073/05 che sono, come abbiamo già anticipato, a carico dell'OSA.

Il controllo può quindi riguardare:

il prodotto finito ancora presente all'interno dello stabilimento di produzione, prima dell'immissione in commercio o prodotti già commercializzati.

La finalità di questo tipo di verifica è la valutazione dell'accettabilità di una determinata partita di alimenti. Considerato che alcune matrici alimentari sono indicate anche con un preciso riferimento alle modalità di consumo -crude o cotte-, nel determinare la modalità di consumo di un alimento, al fine di applicare correttamente i CSA, gli organismi di controllo ufficiale al momento del prelievo tengono conto, ai sensi dell'art. 14 del Reg. (CE) num. 178/2002, delle indicazioni fornite dall'etichetta nonché delle normali condizioni di utilizzo dell'alimento determinate anche in base alle consuetudini locali.

Diversamente dalla valutazione della sicurezza o integrità di un lotto o di un prodotto o dalla verifica del sistema di

autocontrollo aziendale (nei quali si applicano obbligatoriamente le modalità di campionamento previste da I Reg. 2073/05) il servizio di controllo ufficiale può applicare modalità di prelievo diverse da quelle dettate nel cap.1 dell'Allegato 1, del citato Regolamento, per quanto riguarda il numero di U.C. definite.

In particolare gli organismi di controllo non sono obbligati a prelevare più U.C. per ciascuna aliquota, quando il criterio microbiologico previsto nel suddetto cap. I, indica che tutte le U.C. analizzate debbano risultare esenti dal patogeno in questione. (vd. Intesa approvata dalla Conferenza Permanente Stato-Regioni del 10 maggio 2007).

I piani di campionamento previsti dal Reg. 2073/05 per i CSA prevedono il prelievo di aliquote formate da diverse U.C., il cui numero differisce in base alla matrice (vd. Tab.1) per attività di controllo ufficiale.

Il Servizio Veterinario, in linea con quanto indicato dall'art. 11 commi (5) e (6) del Reg. (CE) 882/04, al fine di verificare quanto messo in atto dall'OSA per garantire i CSA effettua un campionamento che assicura il rispetto del diritto dello stesso operatore di avere a disposizione campioni per ulteriori indagini. In questo caso quindi gli organi di controllo ufficiale si atterranno al rispetto delle procedure di campionamento previste dalla Legge

283/62, dal suo Regolamento di attuazione approvato con il DPR 327/80 e dal DM del 16/12/1993.

Il prelievo ai sensi del D.Lvo 123/93 terrà conto delle 4/5 aliquote ciascuna costituita dal numero di U.C. indicato nel Reg. n. 2073/2005.

È pur vero che in fase di vigilanza presso i piccoli esercizi al dettaglio per ridotta quantità di prodotto o numero insufficiente di campioni risulta difficoltoso reperire le 25 U.C. (5 per ogni aliquota) compromettendo il diritto alla difesa dell'interessato, si può altresì verificare il caso di campionare prodotti alimentari che presentano una scadenza ravvicinata.

In questi casi si procederà al prelievo di "un campione unico garantito" in una sola aliquota (formata dal numero di U.C. previsto dal Reg. 2073/05) ed ad una analisi unica irripetibile.

Ciò va menzionato nel relativo verbale di prelievo e ne va informato tanto il produttore/esercente, quanto il laboratorio.

Numero di aliquote da prelevare (artt. 7 e 16) del D.P.R. 327/80.

Il campione è costituito da 5 aliquote:

- 1 aliquota per il detentore della merce.
- 1 aliquota per il produttore della merce (eventualmente presente).
- 1 per l'esame di prima istanza.
- 1 per l'esame di seconda istanza.
- 1 per l'autorità giudiziaria.

Tale numero subisce variazione qualora venisse effettuata:

1. L'apertura ufficiale del campione, pertanto non viene effettuata l'aliquota per la seconda istanza.

2. Campione insufficiente, viene effettuata un'unica aliquota con le U.C. richieste dalla norma.

3. In alcuni casi può rendersi necessario allestire un unico campione con 1 aliquota e senza U.C. ad esempio in casi di tossinfezione alimentare per cui si parla di **REPERTO.**

In questi ultimi 2 casi si rende necessario assicurare il Diritto alla Difesa (Riferimenti normativi: D.Lgs. del 28 luglio 1989 num. 271 art. 223), con la convocazione della parte nelle fasi di prima istanza.



Foto 1. Aliquota



Foto 2. Aliquota
Frazione di campione ottenuta dalla sua suddivisione in parti quanto più possibile omogenee; ciascuna aliquota deve essere sigillata e corredata di cartellino.



Foto 3. Unità Campionaria (U.C.)
Porzione del campione che andrà a comporre una aliquota; le singole U.C., il cui numero è fissato da norme specifiche, sono separate, chiuse ma non sigillate con piombino né corredate di cartellino. Le analisi vengono condotte su una singola aliquota alla volta, tutte le unità campionarie di una aliquota vengono analizzate nello stesso momento.

Numero di Unità Campionarie

Ogni aliquota deve essere costituita da un numero di U.C. variabile in base alla matrice, in applicazione del Reg. 2073/2005.

Nel campionamento a tre classi, verranno rispettati i seguenti criteri:

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

Quando la matrice o il microrganismo da ricercare non è previsto dalla normativa vigente.

Spesso ci si trova nella necessità di effettuare prelievi su matrici non oggetto della normativa comunitaria vigente; nello stesso modo è possibile avere la necessità di richiedere la ricerca di patogeni non contemplati dal Reg. (CE) 2073/05.

In queste situazioni e sempre che si tratti di prodotti alimentari nazionali è prevista l'applicazione della normativa nazionale in vigore: 4 o 5 aliquote ognuna con una unica unità campionaria (Legge 283/1962, DPR 327/80, D.Lvo 123/93).

Di seguito sono riportati alcuni esempi.

MATRICE:	NORMATIVA EUROPEA:	NORMATIVA NAZIONALE:
Prodotti sfusi o preconfezionati all'origine da consumarsi previa cottura.	Non si applica (il Reg. 2073/05 non obbliga l'OSA alla ricerca di <i>L. monocytogenes</i> in questi tipi di prodotti).	OM 7-12-93. (<i>L. monocytogenes</i>)
Prodotti alimentari preconfezionati all'origine destinati al consumo senza trattamenti di cottura (ready to eat).	Reg. (CE) 2073/05.	D.Lvo 123/93. Prelievo in 4-5 aliquote.
Carne macinata e preparazioni a base di carne destinate ad essere consumate crude.	Reg. (CE) 2073/05.	D.Lvo 123/93. Prelievo in 4-5 aliquote.
Carne macinata e preparazioni a base di carne di pollame destinate ad essere consumate cotte.	Reg. (CE) 2073/05.	D.Lvo 123/93. Prelievo in 4-5 aliquote.
Carne macinata e preparazioni a base di carne di animali diversi dal pollame destinate ad essere consumate cotte.	Reg. (CE) 2073/05.	D.Lvo 123/93. Prelievo in 4-5 aliquote.

MATRICE:	NORMATIVA EUROPEA:	NORMATIVA NAZIONALE:
Carni separate meccanicamente.	Reg.(CE)2073/05.	D.Lvo 123/93. Prelievo in 4-5 aliquote.
Prodotti a base di carne destinati ad essere consumati crudi, esclusi i prodotti per i quali il procedimento di lavorazione o la composizione del prodotto eliminano il rischio di Salmonella.	Reg. (CE) 2073/05.	D.Lvo 123/93. Prelievo in 4-5 aliquote.
Prodotti a base di carne di pollame destinati ad essere consumati cotti.	Reg. (CE) 2073/05.	D.Lvo 123/93. Prelievo in 4-5 aliquote.
Latte in polvere e siero di latte in polvere (*).	Reg. (CE) 2073/05.	D.Lvo 123/93. Prelievo in 4-5 aliquote.
Formaggi, burro e panna ottenuti da latte crudo o da latte sottoposto a trattamento termico a temperatura più bassa della pastorizzazione (esclusi prodotti per i quali il produttore a motivo del tempo di maturazione e l'Aw. è in grado di escludere il rischio Salmonella).	Reg. (CE) 2073/05.	D.Lvo 123/93. Prelievo in 4-5 aliquote.
Latte sterilizzato.	Non si applica.	D.Lvo 123/93. Prelievo in 4-5 aliquote.
Latte UHT.	Non si applica.	OM 11/10/78. (CBT a 32°C e a 55°C).

MATRICE:	NORMATIVA EUROPEA:	NORMATIVA NAZIONALE:
Latte pastorizzato.	Non si applica (si applica solo il cip enterobacteriaceae che sostituisce il criterio coliformi).	
Gelati, esclusi i prodotti per i quali il procedimento di lavorazione o la composizione del prodotto eliminano il rischio di Salmonella spp.	Reg. (CE) 2073/05.	D.Lvo 123/93 se posto già in vendita. OM 11/10/78 se il prodotto è ancora nello stabilimento.
Latte in polvere per l'alimentazione prima infanzia e siero di latte in polvere.	Reg. (CE) 2073/05.	OM 11/10/78. (Carica batterica totale e coliformi e Staphilococcus aureus).
Prodotti a base di uova o alimenti contenenti uova crude.	Reg. (CE) 2073/05.	D.Lvo 123/93.
Uova sgusciate, pastorizzate, congelate, tuorlo pastorizzato congelato.	Non si applica.	OM 11/10/78.
Albume sgusciato pastorizzato congelato.	Non si applica.	OM 11/10/78.
Uova pastorizzate in polvere.	Non si applica.	OM 11/10/78.
Alimenti in polvere per lattanti e alimenti dietetici in polvere a fini medici speciali destinati ai bambini di età inferiore ai 6 mesi.	Reg. (CE) 2073/05.	D.Lvo 123/93.

MATRICE:	NORMATIVA EUROPEA:	NORMATIVA NAZIONALE:
Piatti della pesca ottenuti con specie ittiche con un tenore elevato di istidina.	Reg. (CE) 2073/05.	D.Lvo 123/93.
Piatti della pesca che hanno subito un trattamento di maturazione enzimatica in salamoia, ottenute con specie ittiche con un tenore elevato di istidina.	Reg. (CE) 2073/05.	D.Lvo 123/93.
Crostacei e molluschi cotti.	Reg. (CE) 2073/05.	D. Lvo 123/93.
Molluschi bivalvi vivi ed echinodermi, tunicati e gasteropodi vivi.	Reg. (CE) 2073/05.	D.Lvo 123/93.
Molluschi bivalvi vivi ed echinodermi, tunicati e gasteropodi vivi.	Reg. (CE) 2073/05.	D.Lvo 123/93.

Benché *L.monocytogenes* sia ampiamente presa in considerazione dai Regolamenti comunitari sembra opportuno soffermarsi su alcuni punti degli stessi.

Qualora nel verbale di prelievo non sia specificato se è richiesta l'analisi quantitativa o qualitativa, il laboratorio effettuerà sempre la determinazione del pH, e della Aw, e sulla base dei risultati si procederà nel modo seguente:

1. *Se la matrice alimentare rientra tra gli "alimenti pronti che non favoriscono la crescita di L.monocytogenes, diversi da quelli destinati ai lattanti e ai fini medici speciali" (cat. 1.3 del Reg.1441/07) si effettuerà l'analisi QUANTITATIVA.*

Rientrano fra questi i prodotti:
con pH < 4,4 o aw < 0,92,
con pH < 5 e aw < 0,94,
con shelf life < a 5 gg se i valori di pH e Aw sono maggiori di quelli indicati. **(Tab.2)**

Il superamento dei limiti previsti comporta la revisione d'analisi (5-4 aliquote) ad eccezione dei prodotti che hanno un periodo di conservabilità inferiore a 5 giorni per i quali si effettuerà sempre analisi unica irripetibile assicurando i diritti alla difesa (2 aliquote).

2. *Se la matrice alimentare rientra tra gli "alimenti pronti che favoriscono la crescita di L.monocytogenes diversi da quelli*

destinati ai lattanti e ai fini medici speciali" (cat. 1.2 del Reg.1441/07). il campionamento viene effettuato sul prodotto finito prima dell'immissione in commercio, l'autorità che effettua il campionamento sulla base della documentazione prodotta dall'operatore che dimostri che il prodotto non supererà le 100 UFC/g. durante il periodo di conservabilità dovrà indicare sul verbale che va applicato il criterio di cui al punto 2.1 rigo 1 (analisi di tipo QUANTITATIVA).

In caso di mancata indicazione il laboratorio applicherà il criterio qualitativo (assenza in 25g.)

Gli alimenti sfusi o preconfezionati destinati per loro natura ad essere consumati previa cottura o che rechino sulla confezione la dizione "da consumarsi previa cottura" eccetto latte e derivati (O.M.7/12/93).

Per tutti gli alimenti che rientrano in questa categoria, è prevista l'applicazione dell'O.M. del 07/12/93.

Normativa che dà precise indicazioni sul tipo di campionamento da effettuare e sui limiti di accettabilità del parametro ricercato.

0.M. 7/12/93: limiti di *L. Monocytogenes* in alcuni prodotti alimentari.

Tab. 1	MATRICE:	ESEMPIO:
<p>PATOGENO: <i>L.monocytogenes</i></p> <p>U.C. (Unità Campionarie): 3</p>	<p>Alimenti crudi non sottoposti al trattamento di riscaldamento.</p> <p>LIMITI: Non oltre 11/g in 1 u.c. Non oltre 110/g in 2 u.c.</p>	
<p>PATOGENO: <i>L.monocytogenes</i></p> <p>U.C. (Unità Campionarie): 5</p>	<p>Alimenti congelati e surgelati.</p> <p>LIMITI: Non oltre 11/g in 2 u.c. Non oltre 110/g in 3 u.c.</p>	
<p>PATOGENO: <i>L.monocytogenes</i></p> <p>U. C. (Unità Campionarie): 5</p>	<p>Alimenti precotti o pastorizzati.</p> <p>LIMITI: Non oltre 11/g in 4 u.c. Non oltre 110/g in 1 u.c.</p>	