



Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

## Progetto Formativo Aziendale

Preparazione dei campioni di prova nella microbiologia degli alimenti.  
Aggiornamenti tecnici

Regole specifiche per la  
preparazione dei  
campioni  
di prodotti alimentari  
vari. Applicazione della  
norma ISO 6887-4:2017



**16 crediti ECM** per  
veterinari, biologi, tecnici di  
laboratorio

*Maria Concetta Campagna – Linda D'Amici*

*15 settembre 2020*





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

# UNI EN ISO 6887 – 4 : 2017

**Microbiologia della catena alimentare - Preparazione dei campioni di prova, della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali per l'esame microbiologico.**

**Norme specifiche per la preparazione del  
PRODOTTI VARI**

## UNI EN ISO 6887 – 4 : 2017

*La presente Norma definisce le regole per la preparazione dei campioni, sospensioni iniziali e successive diluizioni per l'esame microbiologico di prodotti alimentari specifici non inclusi nelle altre parti della ISO 6887 ed **esclude la preparazione dei campioni da sottoporre a metodi microbiologici qualitativi (esame colturale-ricerca) e quantitativi (esame colturale – conta UFC) in cui i dettagli di preparazione sono specificati negli standard internazionali pertinenti.***

*Nello specifico trattasi di un'ampia gamma di prodotti vari.  
**Si prepara una sospensione iniziale per ottenere una distribuzione quanto più uniforme possibile dei microorganismi contenuti nella porzione da analizzare.***



## ***Alimenti interessati***

- a. Prodotti acidi;*
- b. Prodotti duri e secchi;*
- c. Prodotti disidratati, liofilizzati e altri prodotti a bassa aw (compresi quelli con proprietà inibitorie);*
- d. Farine, cereali integrali, sottoprodotti di cereali;*
- e. Alimenti per animali, dolci per bestiame, crocchette e prodotti da masticare per animali domestici;*
- f. Gelatina in polvere e fogli;*
- g. Margarine, creme spalmabili e prodotti non caseari con aggiunta di acqua;*
- h. Uova e uovo-prodotti;*







## ***Alimenti interessati***

- i. Prodotti da forno, pasticcini e torte;*
- l. Frutta e verdura fresca;*
- m. Prodotti fermentati e altri prodotti contenenti microorganismi vitali;*
- n. Bevande alcoliche e analcoliche;*
- o. Prodotti proteici alternativi;*



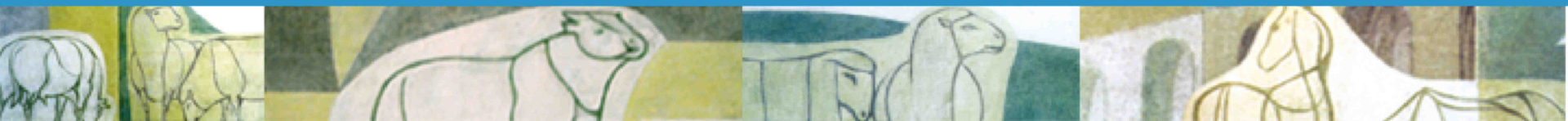
## RIFERIMENTI NORMATIVI

**ISO 7218**

*Microbiologia degli alimenti e degli alimenti per animali - Requisiti generali e linee guida per gli esami microbiologici*

**ISO 6887-1**

*Microbiologia della catena alimentare- Preparazione di campioni di prova, sospensione iniziale e diluizioni decimali per esame microbiologico- Parte 1: Regole generali per la preparazione della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali.*





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

## PREMESSA

**I microrganismi non sono distribuiti in maniera uniforme negli alimenti.**

**Essi possono essere anche stressati dai processi di trasformazione e conservazione degli alimenti**

## PERTANTO

**è necessario allestire opportunamente la porzione di prova affinché essa sia rappresentativa del campione di laboratorio e contenga una distribuzione più uniforme possibile dei germi.**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

**Campione di laboratorio** - campione preparato per essere inviato al laboratorio e destinato all'ispezione o all'analisi

**Campione di prova** - campione preparato dal campione di laboratorio secondo una procedura specifica riportata nel metodo di prova e da cui sono prelevate le porzioni di prova

**Porzione di prova** - campione rappresentativo misurato (in volume o in massa) prelevato dal campione di laboratorio da utilizzare per la preparazione della sospensione iniziale







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



## ***Diluenti per uso generale*** **menzionati ISO 6887 – 1: 2017**

☐ **Soluzione peptonata salata – Peptone salt solution  
(PTWS) NaCl 0,85%**

☐ **Acqua peptonata tamponata - Buffered Peptone Water  
(BPW)**





## ***Diluenti per uso speciale***

☐ **BPW a doppia concentrazione** - Double-strength buffered peptone water **menzionato ISO 6887 – 1: 2017** (*viene utilizzato per prodotti molto acidi  $pH < 4,5$  per ottenere una soluzione iniziale di  $pH = 7,0 \pm 0,5$* )

☐ **Diluyente fosfato tamponato** è utilizzato come diluente per le gelatine





## Soluzioni enzimatiche

- ❑ **Soluzione di  $\alpha$ -amilasi** è utilizzata per migliorare la solubilità dei prodotti a base di amido rigonfiante, cereali e prodotti contenenti cereali (frazione del 1% del volume quindi in ragione di 10 ml a 1000ml di diluente).
- ❑ **Soluzione di cellulasi** è utilizzata per migliorare la solubilità della carbossimetilcellulosa, semi di carrube, carrube, guar e gomme di cassia (frazione del 1% del volume quindi in ragione di 10 ml a 1000 ml di diluente).
- ❑ **Soluzione di papaina** è utilizzata per migliorare la solubilità della gelatina (frazione del 2% del volume quindi in ragione di 20 ml a 1000 ml di diluente).





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

BILANCIA

OMOGENIZZATORE ROTATIVO

OMOGENIZZATORE PERISTALTICO

GRATTUGGIA DOMESTICA

BAGNOMARIA

FORBICI – COLTELLI – BISTURI- PINZE STERILI

SPATOLE-CUCCHIAI O MISURINI STERILI

UTENSILI PER IL CAROTAGGIO IN MATERIALE  
STERILIZZABILE

AGITATORE

BEUTE DA 500 ML

## 6 APPARECCHIATURA





# Attrezzature per il prelievo delle porzioni di prova



11x38

15x21

19x30

30x30

30x60

8x18

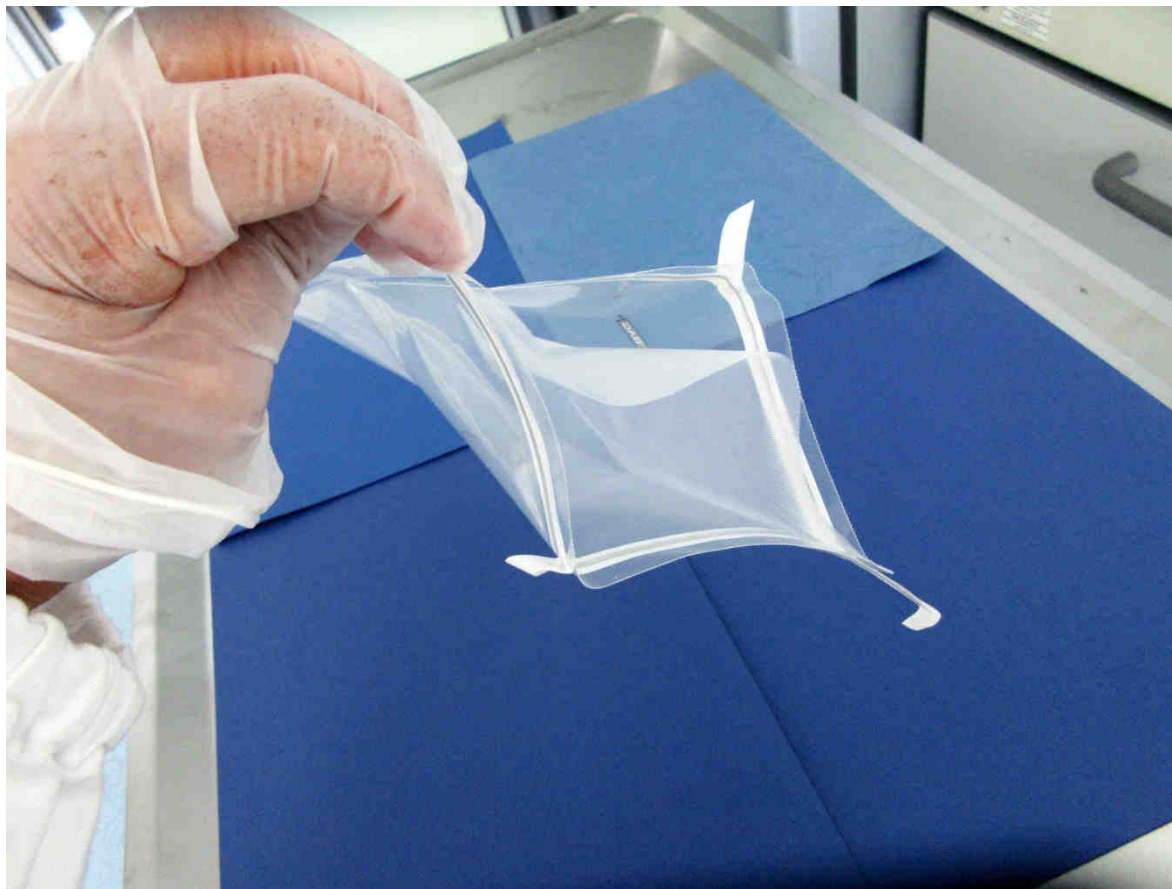
14x23

18x30

25x37

RWV





***Si consiglia l'utilizzo di sacchetti con l'insero filtrante per facilitare il pipettaggio di prodotti con sostanze insolubili in sospensione***



Diagramma di un sistema di pesatura con un piatto di pesatura e un contenitore per la raccolta dei residui.

1. Piatto di pesatura  
2. Contenitore per la raccolta dei residui  
3. Piatto di pesatura  
4. Contenitore per la raccolta dei residui

Il sistema è utilizzato per la pesatura di campioni e la raccolta dei residui.

1. Piatto di pesatura  
2. Contenitore per la raccolta dei residui  
3. Piatto di pesatura  
4. Contenitore per la raccolta dei residui

Il sistema è utilizzato per la pesatura di campioni e la raccolta dei residui.

Diagramma di un sistema di pesatura con un piatto di pesatura e un contenitore per la raccolta dei residui.

1. Piatto di pesatura  
2. Contenitore per la raccolta dei residui  
3. Piatto di pesatura  
4. Contenitore per la raccolta dei residui

Il sistema è utilizzato per la pesatura di campioni e la raccolta dei residui.







Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

# PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

*Tutte le preparazioni e le manipolazioni devono essere eseguite utilizzando tecniche asettiche e attrezzature sterili (come indicato nella ISO 7218).*



## ISO 6887-4 par.9.5

### 9.5 UOVA E PRODOTTI A BASE DI UOVA DISINFEZIONE DEL GUSCIO

*Rimuovere lo sporco o le feci con un panno umido e asciugare tamponando*

*Indossando guanti sterili e utilizzando una garza pulita o una salvietta imbevuta di una soluzione di etanolo al 70% pulire l'intera superficie del guscio. Ciò riduce il rischio di contaminazione del tuorlo d'uovo e dell'albume quando l'uovo viene aperto per rimuovere il contenuto. Lasciar asciugare completamente senza ricontaminare i gusci prima di rompere l'uovo per prendere la porzione di prova.*



## 9.5 UOVA E PRODOTTI A BASE DI UOVA

### ✓ *Microflora del guscio d'uovo:*

*1. metodo mediante il risciacquo del guscio d'uovo*





## 9.5 UOVA E PRODOTTI A BASE DI UOVA

### ✓ *Microflora del guscio d'uovo:*

#### 2. metodo di attrito





## 9.5 UOVA E PRODOTTI A BASE DI UOVA

### ✓ *Microflora del guscio d'uovo:*

#### 3. Metodo di ammollo



## 9.5 UOVA E PRODOTTI A BASE DI UOVA

### ✓ **Microflora interna:**

*Usando guanti e bisturi sterili per ogni uovo, rompi le uova e metti tutto l'albume e tuorlo in un sacchetto sterile ed aggiungere l'opportuno diluente o brodo di arricchimento richiesto dalla specifica ISO considerato come sospensione iniziale mantenendo il rapporto 1 a 10.*



## **9.3 GELATINA IN POLVERE E FOGLIA**

*PREPARAZIONE CAMPIONE: Prelevare una porzione di prova di 20 g del campione di laboratorio utilizzando tecniche asettiche.*

*PREPARAZIONE SOSPENSIONE INIZIALE: Trasferire la porzione da analizzare in una beuta da 500 ml, aggiungere 180 ml di diluente tamponato con fosfato e mescolare per disperdere i granuli nel liquido. Lasciare che la gelatina adsorba il diluente per 60 min a  $T^\circ$  ambiente ( $18^\circ\text{C}$  -  $27^\circ\text{C}$ ). Mettere la beuta nel bagnomaria a  $T^\circ$  tra  $44$ - $47^\circ\text{C}$  per 30 min, mescolare frequentemente per sciogliere la gelatina per ottenere la sospensione iniziale 1 /10.*

*In alternativa si può utilizzare la papaina per sciogliere la gelatina.*





## 9.7 Frutta e verdura fresca (preconfezionata)

*PREPARAZIONE CAMPIONE: Omogenizzare l'intero campione di laboratorio per riflettere la microflora dell'intero articolo e prendere una porzione di prova rappresentativa. Diluire la porzione da analizzare 1/10 con acqua peptonata tamponata (BPW).*

*Omogeneizzare utilizzando un omogenizzatore peristaltico fino ad ottenere una sospensione iniziale adeguata.*





## **9.2 Farine, cereali e sottoprodotti di cereali e mangimi animali**

*Mescolare bene le polveri secche nel contenitore del campione, utilizzando attrezzatura sterile, dopodichè pesare la porzione da analizzare ed aggiungerla al volume richiesto di soluzione peptonata salata (PTWS) per ridurre al minimo lo shock osmotico alla microflora. Questa è la diluizione iniziale 1/10. Prima dell'omogeneizzazione, lasciare riposare per 20-30 minuti a temperatura ambiente di laboratorio (18-27°C) per favorire la rianimazione degli organismi danneggiati. Mescolare per  $60\text{ s} \pm 5\text{ s}$  utilizzando un omogeneizzatore peristaltico. I materiali duri (es. cereali, semi) possono perforare i sacchetti di plastica, quindi si consiglia di usare doppio sacchetto per prevenire perdite e contaminazioni. Le porzioni di prova possono anche essere frantumate con un oggetto pesante es. martello prima dell'omogeneizzazione.*

## 9.2 Alimenti ricchi di grassi (oltre il 20%)

*Un diluente con un valore compreso tra 1g/l e 10g/l di polisorbto 80 (**Tween 80**) in base al contenuto di grassi stimato deve essere utilizzato per migliorare il processo di emulsione durante la sospensione (es. per un contenuto in grassi del 40% aggiungere 4 g/l).*

*Nell'esempio il campione conteneva 29 g di grasso su 100 g di prodotto.*



## 9.6 Prodotti da forno, pasticceria e dolci

*Per i prodotti confezionati, aprire la confezione in modo asettico. Omogeneizzare l'intero campione di laboratorio per riflettere la microflora dell'intero articolo dopodichè pesare la porzione di prova in un sacchetto di plastica ed aggiungere il diluente pre-riscaldato 37°C-40°C. Lasciare la sospensione a temperatura ambiente (18°C- 27°C) per 20 minuti affinchè si dissolva. Quindi mescolare completamente utilizzando l'omogeneizzatore peristaltico. Per i prodotti secchi e duri per evitare un aumento eccessivo della temperatura:*

- Non omogeneizzare in un omogenizzatore rotativo per più di 2,5 minuti*
- Se necessario tritare o macinare il campione di laboratorio per un max di 1min per evitare aumento eccessivo della temperatura*
- Sosta di 1 ora a T° ambiente per favorire il recupero dei microorganismi stressati.*





## ***9.4 Margarina e creme spalmabili***

**La diluizione si può allestire utilizzando anche solo la fase acquosa.**

I campioni possono essere prelevati dall'interno del prodotto sfuso o dall'interno e/o sulla superficie degli articoli confezionati utilizzando tecniche asettiche togliendo uno strato di circa 3-5 mm sulla superficie ed effettuare il carotaggio del campione al centro. Si prelevano una porzione di prova di 50 g contenente un rapporto volume/massa di acqua espresso in % ( $W$  ml/100 g). Aggiungere  $(50 - [50 \times W / 100])$  ml di diluente per uso generale preriscaldato a bagnomaria a  $(44 - 47)^\circ\text{C}$ . Mettere il contenitore in un bagnomaria a  $T^\circ$  di  $44-47^\circ\text{C}$  fino a quando il prodotto si scioglie. Togliere dal bagnomaria, agitare bene e lasciare separare le fasi per non più di 15 minuti. Si può utilizzare anche una centrifuga. Prelevare con una pipetta sterile lo strato inferiore. In queste condizioni, 1 ml della fase acquosa corrisponde a 1 g di prodotto.



## **9.10 PRODOTTI PROTEICI ALTERNATIVI**

**Insetti cotti:** pesare la porzione da analizzare in una busta di plastica con filtro e diluire 1/10 con acqua peptonata tamponata (BPW). Omogenizzare in un omogenizzatore peristaltico fino ad ottenere una sospensione iniziale idonea. Alcuni insetti con un esoscheletro chitinoso della cuticola, come le locuste, possono perforare il sacchetto, quindi utilizzare doppio sacchetto per evitare perforazioni e perdite. Le porzioni di prova possono anche essere parzialmente frantumate con un oggetto pesante, come un martello prima dell'omogeneizzazione.

**Proteine vegetali testurizzate e micoproteine:** pesare la porzione da analizzare in una busta di plastica con filtro, per ridurre il trascinamento dei residui di particolato, e diluire 1/10 con acqua peptonata tamponata (BPW).



