



Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

## **Regole Specifiche per la preparazione dei campioni di carne e prodotti a base di carne per l'analisi microbiologica**

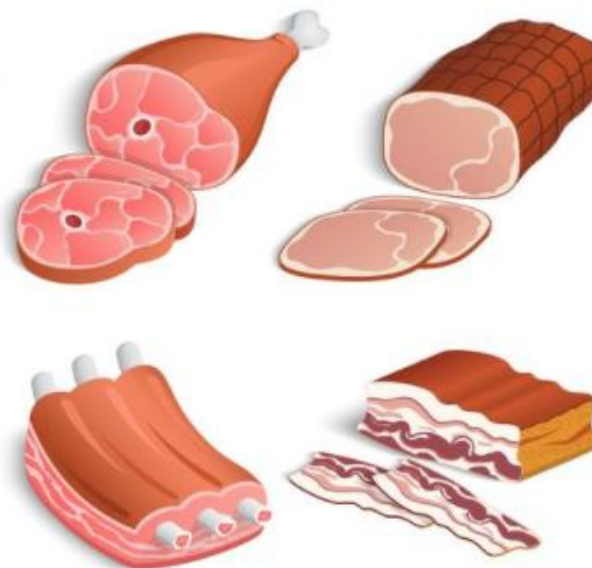
### **Applicazione della norma UNI EN ISO 6887-2:2017**

**Dr.ssa Paola Marconi**

Progetto Formativo Aziendale

*Preparazione dei campioni di prova nella microbiologia  
degli alimenti -Aggiornamenti tecnici*

*8-15-22-29 settembre 2020*



# Indice

## **Introduzione**

Matrici alimentari: influenza del fattore matrice sui metodi microbiologici

## **ISO 6887-2:2017**

Tutti i punti della norma

Procedure specifiche



### **Principi per la preparazione dei campioni:**

- Non danneggiare il microrganismo
- Garantire una uniforme distribuzione del microrganismo ricercato

Le profonde differenze di matrici e prodotti, anche se compresi nella stessa categoria alimentare, rendono indispensabile una approfondita conoscenza della loro composizione per individuare criticità nei confronti dell'attività di prova del laboratorio (preparazione dei campioni e loro sospensioni)

Il tema « **matrice** »:

è centrale nelle versioni più aggiornate delle norme tecniche ma è particolarmente sviluppato in quelle relative alla verifica dei metodi



### *La preparazione del campione riveste un ruolo centrale nell'analisi microbiologica*

- La matrice può influenzare in maniera significativa il risultato del metodo
- La norma 16140/3 impone di eseguire la verifica dei metodi di nuova implementazione su una gamma di matrici selezionate tra quelle più rilevanti per il laboratorio
- Le norme tecniche più aggiornate riportano studi di validazione inter-laboratorio complessi ed applicati su una ampia serie di matrici alimentari i cui risultati costituiscono valori di riferimento per il laboratorio utilizzatore
- La norma ISO 6887 1-6 è costantemente citata nelle norme relative alla validazione dei metodi



# Influenza della Matrice sulle performances analitiche

*Il laboratorio utilizzatore deve dimostrare la competenza  
nell'applicare il metodo validato sulle matrici o prodotti solitamente  
analizzati dal laboratorio*

- **Metodi qualitativi**

la matrice influenza il limite di rilevazione del metodo

Il laboratorio deve selezionare singole matrici in base ad elementi di criticità che potrebbero influenzare l'affidabilità dei metodi applicati

- **Metodi quantitativi**

l'effetto matrice è considerato tra i «fattori indesiderabili» per il calcolo dell'incertezza, ma per la verifica dei metodi può essere scelta una qualsiasi matrice





## Scelta delle Matrici

Nella scelta delle matrici da testare per la verifica dei metodi (applicabilità e verifica di matrice) si considera:

- criticità della matrice
- rappresentatività per il laboratorio

La 16140/3 3°draft propone una classificazione in:

**Categoria**

*es. carne cruda*

**Tipo**

*es. carni fresche*

**Matrice**

*es. preparazioni a base di carne*







## Criticità di matrice

Livelli di microbiota

Contenuto in grassi

pH

Contenuto in sale

Attività dell'acqua

Presenza di composti antimicrobici

**Table B.1 — Example of (food) items and its characteristics**

Category	Item	Challenging characteristic
1	1	pH
2	2	Viscosity
3	3	Fat content
4	4	High background microbiota and pH
5	5	Polyphenol

3<sup>rd</sup> draft ISO/FDIS 16140-3



## Caratteristiche di matrice interferenti con i principi dei differenti metodi

Tabella B.2 Esempio di caratteristiche di matrice interferenti con principi di differenti metodi

3<sup>rd</sup> draft ISO/FDIS 16140-3

Metodo	Elevato numero di microrganismi competitivi		Caratteristiche fisiche				Composti chimici			
	Microbiota tecnologico	Elevato background microbiota, alterazione	pH	a <sub>w</sub>	solubilità viscosità	Coloranti	Vanillina, sale..	Enzimi	Polifenoli	Inibitori molecolari
Cultural method	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Immuno-enzymatic	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Molecular test	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Flow cytometry	x	x	x	x	x	x	x			
ATP	x	x	x	x	x	x	x			







## Relazione matrice/patogeno 1/4

Per le sue caratteristiche chimico fisiche, di conservazione, di complessità produttiva ogni matrice/prodotto è riferita ad un profilo di **rischio microbiologico** per contaminazioni che possono verificarsi in qualsiasi punto della fase produttiva

Le determinazioni analitiche sono quindi finalizzate alla ricerca/conteggio di patogeni/tossine di interesse epidemiologico umano o di microrganismi la cui proliferazione può influenzare la qualità igienico-sanitaria del prodotto

Sia la normativa di validazione dei metodi che la normativa nazionale relativa ai piani di controllo si basa su tali principi



3<sup>rd</sup> draft ISO/FDIS 16140-3

Categories	Types	Items (some examples)	Total viable count	Lactic Acid Bacteria	Yeasts and moulds	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Coagulase positive staphylococci	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. monocytogenes	Shiga toxin- producing E. coli (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	(Pathogenic) Yersinia enterocolitica	Vibrio spp.	Bacillus cereus (vegetative cells or spores)	Clostridium perfringens (vegetative cells or spores)	Clostridium botulinum (vegetative cells or spores)
Raw meat and ready-to-cook meat products (except poultry)	Fresh meats (unprocessed)	Carcasses, meat cuts, Carpaccio's	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y				
		Minced meat, meat preparations , Carpaccio's	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y				
		Carcasses, swabs, rinsates	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y				
	Ready-to-cook (processed)	Frozen burger patties, marinated beef shish- kabobs	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y				
Ready-to-eat, ready-to-reheat	Cooked meat products	Cooked ham, pâté	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y		Y	Y	Y



# Relazione matrice/patogeno 3/4

3<sup>rd</sup> draft ISO/FDIS 16140-3

Categories	Types	Items (some examples)	Total viable count	Lactic Acid Bacteria	Yeasts and moulds	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Coagulase positive staphylococci	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. monocytogenes	Shiga toxin-producing E. coli (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	(Pathogenic) Yersinia enterocolitica	Vibrio spp.	Bacillus cereus (vegetative cells or spores)	Clostridium perfringens (vegetative cells or spores)	Clostridium botulinum (vegetative cells or spores)
meat products	Fermented or dried meat products	Salami	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y		Y	Y	Y
	Raw cured (smoked) ( $a_w > 0,92$ )	Filet de saumon, lard	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y		Y	Y	Y
	Raw cured (smoked) ( $a_w < 0,92$ )	Cobourg ham, dry cured ham	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y							
	Canned meat (ambient stable)	Corned beef															Y	Y	Y
Raw poultry and ready-to-cook poultry products	Fresh meats (unprocessed)	Carcasses, meats, cuts	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y					
		Carcasses, swabs, rinsates	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y					
		Minced meat, meat preparations	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y					



## Relazione matrice/patogeno 4/4









3<sup>rd</sup> draft ISO/FDIS 16140-3

Categories	Types	Items (some examples)	Total viable count	Lactic Acid Bacteria	Yeasts and moulds	Enterobacteriaceae	Escherichia coli	Coagulase positive staphylococci	Salmonella spp.	Listeria spp.	L. monocytogenes	Shiga toxin-producing E. coli (STEC)	Cronobacter spp.	Campylobacter	(Pathogenic) Yersinia enterocolitica	Vibrio spp.	Bacillus cereus (vegetative cells or spores)	Clostridium perfringens (vegetative cells or spores)	Clostridium botulinum (vegetative cells or spores)
	Ready-to-cook products (processed)	Seasoned chicken breasts	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y					
Ready-to-eat, ready-to-reheat meat poultry products	Cooked meat products	Cooked turkey filet	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y			Y	Y	Y
	Fermented or dried meat products	Chicken sausage	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y			Y	Y	Y
	Raw cured (smoked) ( $a_w > 0,92$ )	Smoked turkey filet	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y			Y	Y	Y
	Canned (ambient stable)	Canned poultry meat, canned duck pâté															Y	Y	Y



## 1. campo di applicazione

Carne fresca, Carne cruda e lavorata, Pollo cacciagione, Loro prodotti

<i>include</i>	<i>esclude</i> 
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ refrigerata</li> <li>○ congelata</li> <li>○ fermentata/stagionata </li> <li>○ macinata </li> <li>○ preparazioni </li> <li>○ carni separate meccanicamente </li> <li>○ carni macina </li> <li>○ carni cucinate </li> <li>○ disidratate/salate (vari gradi) </li> <li>○ estratti</li> <li>○ carotaggio e tamponi da carcasse</li> </ul>	<p>ISO 17604      prelievo carcasse</p> <p>ISO 6887-6      produzione primaria</p> <p>Norme tecniche in cui i dettagli di preparazione sono specificati negli standard internazionali pertinenti.</p>

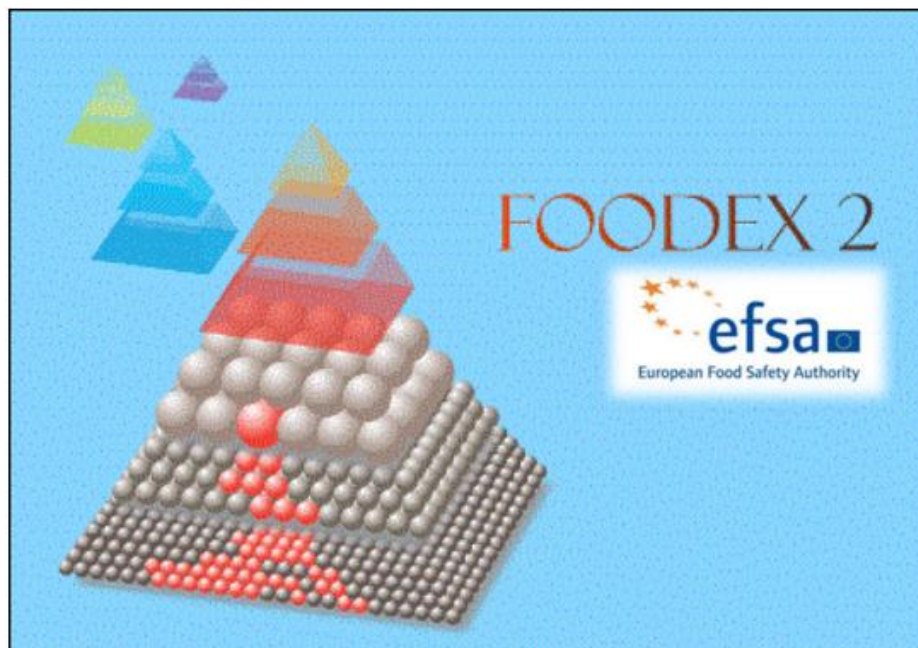




## PRA

MACROCATEGORIA	MATRICE	Codici Foodex
CARNE FRESCA, PRODOTTI A BASE DI CARNE, PREPARAZIONI DI CARNE, CARNI SEPARATE MECCANICAMENTE	CARNE FRESCA (di qualsiasi specie)	A01QS
	CARNI MACINATE, PREPARAZIONI A BASE DI CARNE, CARNI SEPARATE MECC.	A01QR
	PRODOTTI A BASE DI CARNE (Tutti)	A01QR

## Linee guida Reg. CE 852-854







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

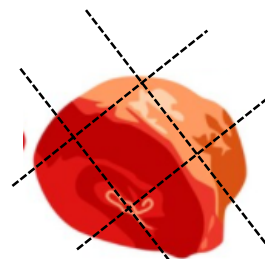
## ISO 6887-2:2017

### 1. normativa di riferimento

ISO 6887/1:2017	Regole Generali preparazione dei campioni
ISO 7218	Regole generali esame microbiologico
ISO 18593	Regole generali campionamento superfici
ISO 17604	Campionamento carcasse



Blocco/grosso pezzo o taglio di carne

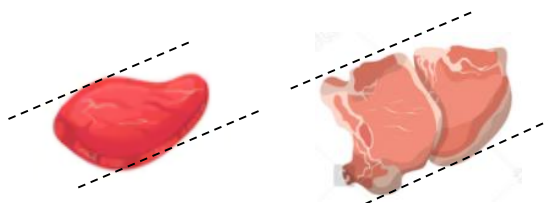


Scaglie

Frammenti



Fetta



Rifilatura



## 5. Diluenti

Non sono richiesti specifici requisiti

Si rimanda alla ISO 6887-1

## 6. Apparecchiature

Cauterizzatore

*Template* per superfici sterile

### Annex A (informative)

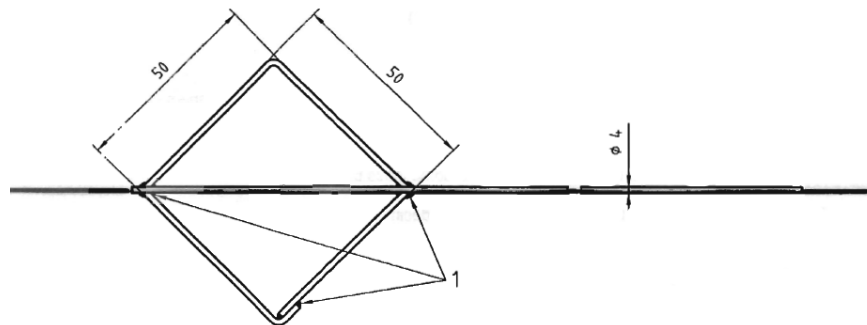
#### Frame for the delineation of a surface sample area

Composition materials may be as follows:

- frame: stainless-steel sheet with a thickness of 3/10 mm;
- handle: stainless-steel cylindrical stem with a diameter of 4 mm.

An example of a suitable frame is shown in Figure A.1.

Dimensions in millimetres





- Congelati, duri, disidratati, liquidi, prodotti non viscosi, prodotti multicomponente
- Carne o prodotti a base di carne preparati o processati in diverse dimensioni
- Tagli di carne sezionati da unità di maggiori dimensioni
- Tagli primari di carne da carcasse
- Scaglie, frammenti da blocchi congelati
- Sottoprodotti di vario tipo
- Preparazioni orientali come zampe di anatra o pollo
- Tessuti altri o tamponi





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

**ISO 6887-2:2017**

**7-2. Campionamento**      **Tipologie campioni**

## Stato fisico

### TEMPERATURA

- Non congelati
- Congelati o surgelati

### ATTIVITÀ DELL'ACQUA

- Non trattati
- Prodotti carnei intermedi in cui la crescita microbica sia inibita come risultato di una ridotta attività dell'acqua





## **8. Preparazione dei campioni**

-Preparazione e manipolazioni in condizioni di **asepsi e attrezzature sterili**

-Include **rilevazione** ed **enumerazione**

Flora microbica da campione prelevato **in profondità**

Flora microbica **superficiale**

Entrambe

-La preparazione del campione dovrà considerare:

lo scopo del campionamento

la natura del campione

-Prodotti **particolari**: acidi (pH 3,5-4,5) e grassi (>20% della massa totale)  
vanno riferiti agli specifici requisiti della 6887-1





**Preparazione iniziale di diverse tipologie di campioni:**

Si applica, per rilevazione ed enumerazione, a campioni per la carica microbica totale in superficie ed in profondità

Usare una quantità rappresentativa del campione di laboratorio per costituire una porzione da testare adeguata a quanto stabilito dal metodo di prova

**Indicazioni particolari**



TIPOLOGIA CAMPIONE	PROCEDURA PRELIEVO PRODOTTI/MATRICI PARTICOLARI
<b>Campioni con massa =/<math>&lt;</math> 50 g</b>	Usare tutto il campione di laboratorio per la preparazione dell'iniziale sospensione
<b>Blocchi grossi, pezzi, tagli di carne</b>	Prelevare la porzione da testare in profondità o in superficie e preparare l'iniziale sospensione
<b>Fette o pezzi di carne o carne cotta</b>	Prelevare strisce o pezzi dal centro della fetta
<b>Frammenti, scaglie</b>	Omogenizzare prima di prelevare
<b>Insaccati</b>	Se il budello non è destinato al consumo, disinfettare il punto di incisione tamponare con alcool 70 % o cauterizzare. Rimuovere la pelle con attrezzi sterili. Tagliare e ridurre in piccoli pezzi
<b>Carni cotte</b>	Rimuovere la confezione e preparare come o prodotti crudi
<b>Zampe di pollo e anatra</b>	Prelevare piccoli pezzi da tutte le parti lungo l'articolazione miscelare, pesare in una busta sterile Aggiungere il diluente in 9 parti del peso ottenuto e massaggiare con le mani per 1-2 minuti per ottenere una iniziale sospensione 1:10



TIPOLOGIA CAMPIONE	PROCEDURA PRELIEVO PRODOTTI/MATRICI PARTICOLARI	
PRECONFEZIONATI	ISO6887/1	
NON CONGELATI	Prelevare la porzione da testare in profondità o in superficie e preparare l'iniziale sospensione	
	In profondità	Cauterizzare la parte superficiale e rimuovere una area di carne da una superficie di estensione appropriata, se in confezione prelevare asetticamente dalla confezione e porre in una vasca sterile, prelevare uno strato di carne e frammentarlo in una busta sterile
	In superficie (escissione, metodo distruttivo)	Prelevare senza cauterizzare la superficie esposta, se in confezione prelevare asetticamente dalla confezione e porre in una vasca sterile, prelevare strisce e frammentarle in una busta sterile
CONGELATI	tutti i tipi	Decongelare prima di manipolare
	congelati grossi blocchi	Non decongelare ISO6887-1



## CONGELATI INDICAZIONI PARTICOLARI

### DI PICCOLE DIMENSIONI

mantenere a temperatura ambiente a

18°C-27°C per un massimo di 3 ore

5°C+/-3°C per massimo 24 ore

In contenitori separati per evitare contaminazioni da sgocciolamento

Esaminare subito dopo anche se permane il congelamento, aggiungere diluente a temperatura ambiente per facilitare lo scongelamento

Non scongelare in bagnomaria

### DI PESO >2KG

Togliere dalla confezione usando forbici o scalpello mettere in un contenitore con la parte piana in alto

#### 1) TOTAL SAMPLE (sup e prof)

Con un trapano (massimo 900r/min) con appropriata punta fare fori nelle posizioni indicate. Con una spatola raccogliere i frammenti e porli in un sacchetto per l'omogenizzazione. Se la massa è >50g omogenare in un sacchetto da cui prelevare poi la porzione da testare. Tutta l'operazione non deve surriscaldare il campione

#### 2) SOLO IN PROFONDITÀ

Usando scalpello e martello rimuovere una superficie di spessore di 2-3mm di spessore in un'area di 6x6cm. Cauterizzare la parte esposta fino alla carbonizzazione. Fare fori nell'area cauterizzata subito sotto la superficie

#### 3) SUPERFICIALE

Col *template* sterile circoscrivere l'area e rimuovere con forbici o scalpello la parte compresa nel *template* dello spessore di 2-3mm, porre in un sacchetto da omogenizzazione



TIPOLOGIA CAMPIONE	PROCEDURA PRELIEVO PRODOTTI/MATRICI PARTICOLARI
<b>Sostanze inibitorie (es: spezie)</b>	eseguire ulteriori diluizioni (1:100, 1:1000) o aggiungere K2SO4 al tampone fino a raggiungere una concentrazione finale dello 0,5% per ridurre l'attività antimicrobica
<b>Gelatine</b>	Prelevare con tecnica asettica 20g dal campione ed aggiungere 180ml di tampone fosfato e miscelare per disperdere i granuli nel liquido. Lasciare la gelatina dissolversi a temperatura ambiente per 60 minuti a temperatura ambiente. Mettere in bagnomaria a 45°C per max 30 minuti, miscelare frequentemente per dissolvere la gelatina e diluire 1+9
<b>Prodotti eterogenei</b>	Prelevare aliquote di ciascun componente rappresentative della proporzione del prodotto iniziale Omogenizzare tutto il campione e quindi prelevare Se è necessario macinare il campione non raggiungere mai temperature elevate e non proseguire oltre 1 minuto
<b>Prodotti ad alto contenuto in grasso</b>	usare diluente contenente Tween 80 in proporzione con i livelli di grasso (es 40% grasso aggiungere 4g/l Tween) per facilitare la sospensione
<b>CARNI DISIDRATATE / parzialmente disidratate</b>	ISO 6887-4 miscelare accuratamente nel loro contenitore, omogenare se necessario
<b>CAMPIONI DI SUPERFICIE (tamponi ed altri dispositivi)</b>	ISO 17604      istruzioni per il prelievo con tampone ISO 18593:2018      preparazione e istruzioni per il calcolo

# Grazie





**A quali norme fa riferimento la ISO 6887-2 relativamente alla preparazione di campioni di carne e prodotti a base di carne?**

- a) ISO 6887/1:2017, ISO 7218, ISO 18593, ISO 17604
- b) ISO 16140-3, ISO 6887/1:2017, ISO 17604
- c) ISO 19036:2009, ISO 6887/1:2017, ISO 6887/4:2017
- d) ISO 16140-3, ISO 19036:2009, ISO 6887/1:2017

Risposta corretta **a)**

**Quale procedura di prelievo si applica nei prodotti congelati di grosse dimensioni nel caso total sample?**

- a) Con un trapano (massimo 900r/min) con appropriata punta fare fori nelle posizioni indicate. Con una spatola raccogliere i frammenti e porli in un sacchetto per l'omogenizzazione
- b) Con uno scalpello ricavare un tassello di grosse dimensioni prelevare il quantitativo richiesto e omogenizzare
- c) Con le forbici prelevare frammenti dalla superficie ed omogenizzare
- d) Lasciare a temperatura ambiente fino allo scongelamento, prelevare ed omogenizzare

Risposta corretta **a)**



**Quale sostanza addizionata al diluente favorisce l'emulsificazione dei prodotti ad alto contenuto in grasso?**

- a) Polisorbati (Tween 80) in proporzione con i livelli di grasso presenti nel campione
- b) Acidificanti
- c) Alcool 70%
- d) Soluzioni tampone preriscaldate a temperatura ambiente

Risposta corretta **a)**

**In quale modo deve essere eseguito il prelievo di zampe di anatra o pollo?**

- a) Frammentando il campione comprendendo nel prelievo anche la parte ossea, poi omogenizzare
- b) Prelevando piccoli pezzi da tutte le componenti lungo l'articolazione miscelare, poi pesare in una busta sterile
- c) Inserire interamente nel sacchetto da omogenizzazione e aggiungere il diluente
- d) Prelevare solo la pelle in superficie

Risposta corretta **b)**



**Quale tipologia di campioni viene esclusa dalla ISO 6887-2 ed è invece di pertinenza della ISO 6887-6?**

- a) I tamponi da carcasse
- b) Le grosse masse di carne congelate
- c) I prodotti a base di carne con livelli di grasso > del 20%
- d) I campioni della produzione primaria

Risposta corretta [d\)](#)

**Il template per quale tipo di prelievo si utilizza**

- a) Profondo
- b) Misto
- c) Di superficie
- d) Per nessuno dei precedenti

Risposta corretta [c\)](#)

