

## PRELIEVO

Il campione portato in laboratorio deve essere RAPPRESENTATIVO dell'intera massa da cui è tratto.

Esistono al riguardo, a seconda dei prodotti e delle finalità per cui vengono effettuate le analisi, disposizioni ufficiali o norme di buon campionamento. Il laboratorio Vallerana è in grado di fornire di volta in volta tutte le informazioni necessarie in conformità alla normativa UNI CEI ISO/IEC 17025.

**N.B.** Il laboratorio non si presta alla creazione di pool di campioni. Eventuali pool devono essere creati e consegnati direttamente dal committente formalizzando la cosa sull'apposito modulo accettazione campioni. Il pool verrà processato come un qualsiasi altro campione di prova.

## CAMPIONAMENTO ALIMENTI PER ANALISI CHIMICHE O MICROBIOLOGICHE

Le quantità minime necessarie al laboratorio per eseguire le analisi di alimenti in generale dipendono dai parametri richiesti. Viene di seguito riportata la tabella 1 in cui vengono indicate le quantità utilizzate dagli operatori per applicare le metodiche più frequentemente richieste dai Clienti al laboratorio Vallerana:

**Tabella 1**

<b>Parametro richiesto</b>	<b>Quantità necessaria per eseguire l'analisi</b>
Ricerca (presenza/assenza) SALMONELLA	30g
Ricerca (presenza/assenza) LISTERIA MONOCYTOGENES	30g
Enumerazione vari parametri (es: carica, coliformi, enterobatteriacee, miceti, stafilococchi, Campylobacter Spp, etc.)	20g
Acqua libera	20g
pH	50g

Sono pertanto richiesti campioni di almeno 150 g o una confezione integra contenente almeno la quantità appena menzionata.

Nel caso in cui solo una parte delle analisi richieste venga svolta da Vallerana e l'altra parte venga subappaltata a terzi è buona norma che il cliente fornisca al laboratorio già due aliquote separate dello stesso campione in modo che una venga utilizzata per le analisi effettuate da Vallerana e l'altra, idoneamente conservata, venga spedita al laboratorio subappaltato.

Esigenze particolari vengono concordate di volta in volta con il laboratorio.

È opportuno che i campioni da analizzare siano riposti in contenitori puliti come sacchetti da stomacher richiudibili o contenitori con tappo a chiusura ermetica.

Qualora siano richiesti parametri microbiologici è necessario utilizzare contenitori sterili, a meno che non siano conferiti nella loro confezione originale integra. Quando sono richieste sia prove microbiologiche sia prove chimiche è preferibile consegnare due aliquote separate.

I campioni deperibili devono essere trasportati in laboratorio nel minor tempo possibile alla temperatura idonea alla loro tipologia:

Campioni refrigerati: la temperatura di questi campioni deve essere mantenuta fra 2°C e 6°C con una tolleranza di +/-2°C (salvo specifiche indicazioni legate al prodotto – vd etichetta). Se possibile i campioni devono essere trasportati in laboratorio entro 24ore dall'effettuazione del campionamento. I campioni possono essere inseriti in contenitori isotermici con una quantità sufficiente di ghiaccio sintetico oppure in frigorifero elettrico motorizzato o in un mezzo refrigerato coibentato.

Campioni surgelati e congelati: I campioni congelati o surgelati devono essere trasportati ad una temperatura inferiore a -15°C per i congelati e -18°C per i surgelati e non devono presentare segni di scongelamento all'arrivo in laboratorio. I campioni possono essere inseriti in contenitori isotermici con una quantità sufficiente di ghiaccio sintetico oppure in congelatori elettrico motorizzati.

Per quanto concerne la ricerca di *Campylobacter Spp*, il campione non deve essere congelato e deve pervenire al laboratorio nel più breve tempo possibile.

**N.B.** Nei casi in cui la temperatura rilevata in accettazione non sia conforme a quanto atteso, sia a causa di un non idoneo trasporto sia per motivi contingenti quali l'elevata temperatura ambientale dei mesi estivi, è di prassi annotare l'anomalia nel modulo di accettazione sottoscritto dal cliente e in qualunque caso avvisare il cliente prima di procedere all'analisi.

## **CAMPIONAMENTO ACQUA PER ANALISI MICROBIOLOGICHE/DI POTABILITÀ**

Al momento del campionamento è necessario considerare con attenzione i volumi di acqua da prelevare, che vengono definiti in funzione dei parametri da determinare, e che devono essere superiori al minimo necessario per procedere allo svolgimento degli esami richiesti. La quantità minima necessaria allo svolgimento delle analisi viene riportata nell'allegato A.

Il prelievo dei campioni microbiologici deve essere effettuato con recipienti sterili contenenti sodio tiosolfato (necessario a neutralizzare il cloro residuo libero), a perfetta tenuta. Le bottiglie utilizzate per prelevare campioni di acqua non devono essere mai sciacquate all'atto del prelievo.

Al momento del prelievo, se effettuato da un rubinetto, rimuovere eventuali tubi di plastica o gomma, quindi sterilizzare a fiamma il rubinetto. Quindi lasciar scorrere l'acqua per alcuni minuti prima di eseguire il prelievo. All'atto del prelievo aprire il contenitore sterile, riempirlo e provvedere alla sua immediata chiusura.

Per campioni di acqua di piscina (acqua di vasca) il prelievo deve essere effettuato per immersione della bottiglia, utilizzando bottiglie sterili (sia internamente che esternamente) e aste per prelievi in profondità opportunamente trattate e disinfettate al fine di evitare eventuali contaminazioni del campione. Le normali indagini sull'acqua della piscina prevedono il campionamento dell'acqua sub superficiale (-10 cm a -30 cm), utilizzando un'asta di campionamento, nella zona della vasca opposta al punto di immissione dell'acqua. Introdurre la bottiglia orizzontalmente per evitare la fuoriuscita del tiosolfato, quindi portarla in posizione verticale finché non si è raccolto il quantitativo di acqua necessario per le analisi da effettuare.

Per il campionamento delle acque di immissione il prelievo deve essere effettuato da rubinetto seguendo le indicazioni sopra riportate.

Subito dopo il prelievo riporre il campione ad una temperatura possibilmente compresa tra 2°C e 8°C (es: borsa termica/frigorifero portatile fornito di piastre refrigeranti).

I campioni vanno analizzati entro le 24 ore dal campionamento.

**PRODOTTO**

ACQUE

**TEMPERATURA TRASPORTO**

Da +2 a +8 °C

È tollerata una fluttuazione di +2°C. Eventuali variazioni rilevate in accettazione verranno riportate sull'RdP nelle Note.

## **CAMPIONAMENTO ACQUA PER ANALISI CHIMICHE**

La quantità minima di acqua per analisi chimiche è indicata nell'Allegato A. Il prelievo deve essere effettuato in un contenitore pulito e possibilmente con tappo a chiusura ermetica.

## **CAMPIONAMENTO SUPERFICI PER ANALISI MICROBIOLOGICHE**

### **(Documento di riferimento: ISO 18593)**

È importante che il laboratorio riceva un campione rappresentativo della superficie testata e che non subisca alterazioni durante il trasporto o lo stoccaggio o che sia inquinato da residui di disinfettanti usati sulla superficie da testare. I disinfettanti specifici hanno un'azione compresa tra i 5-15 minuti, quindi attendere per un periodo in accordo con le specifiche del disinfettante in uso prima di effettuare il campionamento.

#### **Tamponi:**

Togliere il tampone sterile dal suo involucro ed inumidirlo immergendo la punta in una provetta contenente il liquido sterile utilizzato per le diluizioni.

Rimuovere il liquido in eccesso dal tampone premendo il tampone stesso sulle pareti della provetta. Procedere al campionamento della superficie da monitorare (da 20 cm<sup>2</sup> a 100 cm<sup>2</sup>) sfregando ruotando la punta del tampone. Comunicare SEMPRE al laboratorio l'estensione della superficie monitorata per poter eseguire il calcolo finale.

Mettere il tampone nella provetta contenente il liquido di diluizione spezzando la porzione di bastoncino del tampone toccata con le dita.

#### **Spugnette:**

Aprire il sacchetto contenente la spugnetta e indossando guanti sterili/puliti prendere la spugnetta. Se la spugnetta non è già umidificata è opportuno bagnarla con 10 ml di soluzione fisiologica. Procedere al campionamento della superficie da monitorare (da 20 cm<sup>2</sup> a 100 cm<sup>2</sup>) strofinando la spugnetta. Comunicare SEMPRE al laboratorio l'estensione della superficie monitorata per poter eseguire il calcolo finale.

Rimettere la spugnetta nel sacchetto richiudendolo con le apposite linguette.

Trasportare il campione in laboratorio nel più breve tempo possibile (entro 24h) e all'interno di una borsa termica/frigorifero portatile tenuto ad una temperatura possibilmente compresa tra 1°C e 8°C.

## **TAMPONI SU CARCASSE**

### **(Documento di riferimento: ISO 17604)**

Di seguito vengono riportati i siti delle carcasse di suino, bovino ed ovino sui quali si consiglia di effettuare il campionamento. Si possono scegliere parti diverse quando si può dimostrare che, in considerazione delle tecnologie di abbattimento adottate in un particolare stabilimento, risulta più probabile che altre parti presentino livelli più alti di contaminazione.

Suini: Lombo – Guancia - Faccia mediale della coscia (prosciutto) - Pancetta

Bovini: Collo - Punta di petto – Pancia - Scamone

Ovini e Caprini: Pancia – Costato - Punta del petto - Petto

#### **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 spugnetta abrasiva (sponge bag). Ciascuna delle quattro aree di campionamento deve essere almeno di 100 cm<sup>2</sup>. Se il campione è costituito da spugnetta, è possibile effettuare contemporaneamente sia la ricerca di *Salmonella* spp, sia il conteggio della carica microbica totale e delle enterobatteriacee. È possibile utilizzare una sola spugnetta per carcassa sui quattro siti.

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

Preparare le spugnette aggiungendo nel sacchetto plastico tipo stomacher una quantità di soluzione sterile peptonata 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.

Dopo avere identificato i siti di campionamento, delimitare l'area di 100 cm<sup>2</sup> (50 cm<sup>2</sup> per le carcasse di piccoli ruminanti) 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 spandere 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 a non entrare in contatto con le 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 cm<sup>2</sup>. La spugna deve 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). 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.

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

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.

Dopo avere identificato i siti di campionamento, delimitare la prima area di 100 cm<sup>2</sup> (50 cm<sup>2</sup> per le carcasse di piccoli ruminanti) 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 spandere 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 a non entrare in contatto con le 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 dal tampone per campionamento. Tamponare 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) avendo cura di ruotare il tampone in modo che tutta la superficie del tampone entri in contatto con la superficie da campionare. Il tampone deve 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 cm<sup>2</sup>. 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.

## METODO DISTRUTTIVO

### Carcasse di ungulati

Nelle carcasse di ungulati 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 cm<sup>2</sup> ciascuno, che costituiscono un

totale di 20 cm<sup>2</sup>. 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 bunsen portatile oppure lasciare che questo evapori naturalmente;
  - attendere che gli strumenti eventualmente si raffreddino prima di utilizzarli nuovamente.
- È consigliabile l'utilizzo di più delimitatori sterili per evitare perdite di tempo dovute alle operazioni di pulizia e sterilizzazione degli strumenti.

### Carcasse di pollame

Se le prove per Salmonella e Campylobacter sono condotte dallo **stesso laboratorio**, in ogni sessione di campionamento sono prelevati casualmente campioni di pelle di collo da almeno 15 carcasse di pollame dopo raffreddamento. Prima di essere esaminati, i campioni di pelle di collo prelevati da almeno tre carcasse di pollame provenienti dallo stesso branco di origine sono aggregati in un unico campione di 26 g. I campioni di pelle di collo formano così 5 campioni finali di 26 g (sono necessari 26 g per la ricerca di Salmonella e Campylobacter in parallelo da un campione). Ai fini della preparazione della sospensione iniziale in laboratorio, la porzione di prova da 26 g è trasferita in 9 volumi (234 ml) di acqua peptonata tamponata (APT) precedentemente portata a temperatura ambiente. La miscela viene trattata in uno stomacher o un pulsifier per un minuto circa. Si evita la formazione di schiuma sottraendo allo stomacher tutta l'aria possibile. Di tale sospensione iniziale 10 ml (~1 g) vengono trasferiti in un tubo sterile vuoto e 1 ml dei 10 ml è usato per il conteggio del Campylobacter su piastre selettive. Il resto della sospensione iniziale (250 ml, ~25 g) si usa per rilevare la Salmonella.

Se le prove per Salmonella e Campylobacter sono condotte in **due laboratori diversi**, in ogni sessione di campionamento sono prelevati casualmente campioni di pelle di collo da almeno 20 carcasse di pollame dopo raffreddamento. Prima di essere esaminati, i campioni di pelle di collo prelevati da almeno quattro carcasse di pollame provenienti dallo stesso branco di origine sono aggregati in un solo campione di 35 g. I campioni di pelle di collo formano così 5 campioni finali di 35 g che sono a loro volta divisi in modo da ottenere 5 campioni finali di 25 g (per la ricerca della Salmonella) e 5 campioni finali di 10 g (per la ricerca del Campylobacter).

### Trasporto al laboratorio

I campioni devono essere analizzati nel più breve tempo possibile dal momento del prelievo e comunque entro le 24 ore. Il tempo tra il campionamento e le prove per il Campylobacter è inferiore a 48 ore. Durante il trasporto al laboratorio i campioni devono essere mantenuti ad una temperatura compresa tra 1°C e 8°C dal momento della raccolta a quello dell'arrivo al laboratorio. I campioni non devono 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 (se impiegati). I campioni che sono scesi a una temperatura di 0 °C non sono usati per controllare la conformità al criterio relativo al Campylobacter. I campioni vanno analizzati entro le 24 ore dal campionamento. All'arrivo in laboratorio i campioni dovranno essere conservati a 3±2°C.

## **CAMPIONAMENTO FECI, MATERIALE CONTAMINATO CON FECI E UOVA PER RICERCA SALMONELLA**

La quantità minima di feci fresche per l'analisi è di almeno 150 grammi; nel caso di materiale contaminato da feci recuperare circa 100 grammi di polveri. È previsto eseguire l'analisi anche utilizzando soprascarpe, in tessuto o comunque materiale assorbente, indossate per camminare nell'allevamento. In caso di ambiente secco preinumidire le soprascarpe con soluzione fisiologica sterile. Nel caso il materiale conferito sia costituito da residui di schiusa la quantità minima da consegnare è di 250 grammi.

Il prelievo (sia esso costituito da feci o da materiale contaminato da feci, da soprascarpe o da residui di schiusa) deve essere messo in un contenitore pulito (barattolo, sacchetto) e consegnato al laboratorio.

Nel caso in cui si debba eseguire la ricerca di Salmonella su uova da consumo prelevare un campione costituito da almeno 10.

In caso si debbano eseguire le analisi in autocontrollo previste dal **PIANO NAZIONALE CONTROLLO SALMONELLOSI NEGLI AVICOLI** le indicazioni sono riportate nel Piano Nazionale Salmonellosi in vigore.

## **CAMPIONAMENTO MATERIALE PER ANALISI DI DIAGNOSTICA**

Sangue:

Il sangue prelevato deve essere raccolto in provette/ependorf senza anticoagulante accuratamente tappate e centrifugabili nel caso il campione non sia sierato. Il campione di sangue per essere analizzabile non deve presentare segni di emolisi.

Carcasse:

Consegnare le carcasse al laboratorio in idoneo involucro/contenitore il prima possibile a partire da decesso (possibilmente entro un giorno) e in ogni caso prima dell'inizio dello stato di decomposizione.

## **RESPONSABILITÀ CAMPIONAMENTO**

L'attività definita di "campionamento", salvo diverse specifiche condizioni formalmente convenute, si intende prestata od espletata a carico e sotto la responsabilità del cliente o del committente; ciò viene indicato sul rapporto di prova dalla stringa riferita al Campionamento "Responsabilità: Cliente o terzi specificandone il nome". A richiesta Vallerana fornisce indicazioni su procedure, tecniche e/o metodi di "campionamento" e di conservazione previste da normative cogenti e/o volontarie.

Le attività di "campionamento" possono essere assunte a carico e/o sotto responsabilità di Vallerana solo su esplicita richiesta del cliente; in questo caso viene indicato sul rapporto di prova nella stringa riferita al Campionamento "Responsabilità: tecnico Vallerana".

Documento emesso da: RAQ

In data: 20/11/2023