

Centro Servizi e Tecnologie Ambientali	ISTRUZIONE OPERATIVA	Allegato 5 alla IOV-02
CAMPIONAMENTO_ ACQUE MICROBIOLOGIA		Rev. 1 Pag. 1 di 6

INDICE

1	SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	2
2	RIFERIMENTI	2
3	DEFINIZIONI	2
4	PERSONALE AUTORIZZATO	2
5	MATERIALE DA UTILIZZARE	2
5.1	Analisi microbiologiche	2
6	MODALITA' OPERATIVE	2
6.1	Generalità sul campionamento	3
6.2	Modalità per analisi microbiologiche	4
6.3	Campionamento per determinazione Legionella	4
6.4	Parametri di campionamento	5
6.5	Trasporto dei campioni	5
7	PIANIFICAZIONE DEI CAMPIONAMENTI	5
8	REGISTRAZIONI ED ARCHIVIAZIONE	5
8.1	Registrazioni minime	6
	Tabella A	6

Preparato da	Verifico ed approvato da	Data
Operatore Tecnico OT	Responsabile Laboratorio RL	17/12/2021
Firma	Firma	
Descrizione delle revisioni	Inserimento di dettagli sulle registrazioni come da OSS 506 e AC 305	

Centro Servizi e Tecnologie Ambientali	ISTRUZIONE OPERATIVA	Allegato 5 alla IOV-02
CAMPIONAMENTO_ ACQUE MICROBIOLOGIA		Rev. 1 Pag. 2 di 6

1 SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Scopo della presente procedura è quello di stabilire le modalità dei campionamenti da parte del laboratorio, al fine di assicurare la validità dei risultati ottenuti, fornire campioni rappresentativi, nonché le modalità di trasporto e manipolazione dei campioni da provare.

Questa procedura si applica ai campioni il cui prelievo è a cura del laboratorio.

2 RIFERIMENTI

Manuale della Qualità	Sezioni 3,: Definizioni; 8.4 Controllo delle registrazioni
Manuale della Qualità	DOC/MAQ/03: Elenco prove
Procedura gestionale	PG-02: Flusso operativo e gestione dei campioni
Procedura gestionale	PG-10: Stima incertezza di misura
Documento	DOC/000/01: Elenco delle matrici, delle prove e dei gruppi di prove.
Documento	DOC/000/04: Elenco delle matrici, delle prove e dei gruppi di prove (sintesi).
Documento	sv gestionale "Teamup"
ISO 19458	Campionamento per analisi microbiologiche
ISO 5667-1	Qualità dell'acqua - Campionamento - Parte 1: Guida alla progettazione di programmi di campionamento e tecniche di campionamento
ISO 5667-2	Qualità dell'acqua - Campionamento- Parte 2: Guida sulle tecniche di campionamento
ISO 5667-3	Campionamento delle acque qualità- - Parte 3: Guida alla conservazione e manipolazione dei campioni di acqua
79/CSR/2015 All.3 + ISO 11731:2017	Deliberazione della Giunta Regionale dell'Emilia Romagna del 21/7/2008, n. 1115 "Approvazione Linee Guida regionali per la sorveglianza e il controllo della Legionellosi". Decreto Direzione Generale Sanità Regione Lombardia del 24/02/2009, n. 1751 "Linee Guida prevenzione e controllo della Legionellosi in Lombardia". Linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi
APAT CNR IRSA	Met. 1030 Man 29/2003: Metodi di campionamento

3 DEFINIZIONI

Nel testo del presente documento sono utilizzate le sigle/abbreviazioni definite nella Sezione 03 del Manuale della Qualità, alla quale si rimanda.

4 PERSONALE AUTORIZZATO

Il personale autorizzato ad eseguire le attività qui riportate è quello definito nel documento DOC/PG-08/02 Scheda autorizzazione, alle quali si rimanda.

5 MATERIALE DA UTILIZZARE

5.1 Analisi microbiologiche

- Bottiglie o bottiglioni sterili per i prelievi (capienza almeno 1 litro), preparate secondo quanto riportato nella *IOV-04, sterilizzazione*, o materiale monouso
- Frigo portatile
- Termometro infrarossi con risoluzione $\geq 0,1^{\circ}\text{C}$
- Termometro a contatto con risoluzione $\geq 0,1^{\circ}\text{C}$
- Guanti monouso
- Flambatore
- Soluzione sanificante

6 MODALITA' OPERATIVE

Centro Servizi e Tecnologie Ambientali	ISTRUZIONE OPERATIVA	Allegato 5 alla IOV-02
CAMPIONAMENTO_ ACQUE MICROBIOLOGIA		Rev. I Pag. 3 di 6

6.1 Generalità sul campionamento

Il sito di campionamento deve presentare caratteristiche rappresentative e tenere conto di eventuali variazioni verticali, orizzontali e temporali ed è identificato con precisione seguendo le raccomandazioni generali della norma ISO 5667-1 e ISO 5667-2, tenendo conto degli aspetti aggiuntivi specifici per microbiologia.

I punti di campionamento dove le condizioni sono instabili dovrebbero essere evitati, e l'eterogeneità del sistema idraulico deve essere presa in considerazione. Negli studi sull'efficacia di disinfezione, il punto di campionamento deve essere scelto per assicurare che la reazione è completa.

Esempi di come l'eterogeneità del sistema può influenzare i risultati sono riportati di seguito.

- Non è equivalente a prendere un sottosuolo o un campione di superficie, o un campione di sottosuolo "contaminato" durante il recupero attraverso la pellicola superficiale. In alcuni casi (ad esempio laghi, piscine), la concentrazione nel film superficie può essere 1.000 volte superiore a quella del sottosuolo.
- Tutti i punti di una rete non sono equivalenti, come ci possono essere vicoli ciechi e sezioni in cui il flusso è ridotto, in particolare se la rete è alimentata da due fonti.
- La qualità in uscita di un serbatoio ben miscelato è generalmente la stessa come nel corpo idrico, ma può essere molto diverso da quello di ingresso.

Il campionamento ad un rubinetto può avere diversi scopi:

- a) per determinare la qualità dell'acqua nelle condutture di distribuzione principali;
- b) per conoscere la qualità dell'acqua che scorre dal rubinetto per essere che può essere alterata dalla rete di servizio all'interno dell'edificio;
- c) per conoscere la qualità dell'acqua come viene consumata, cioè che scorre dal rubinetto (eventualmente contaminato).

Il miglior campionamento dei campioni per la valutazione della qualità nel caso principale [caso a] è eseguito da rubinetti speciali (anche nel sistema di distribuzione) che sono vicini alla distribuzione principale, puliti, senza accessori e disinfettabili mediante esposizione alla fiamma o equivalente adatto.

I rubinetti normali possono essere utilizzati per valutare la qualità nella rete [ancora caso a], se sono disinfettabili flambando tranne nel caso di risultati non chiari, quando si consideri la rete di servizio come potenziale fonte di contaminazione.

La situazione descritta nel caso b) è il metodo di scelta per valutare la qualità dell'acqua potabile compresa l'influenza della rete di servizio all'interno dell'edificio. In questo caso, rubinetti disinfettabili flambando non sono sempre disponibili e altri metodi di disinfezione (applicazione di ipoclorito soluzione, etanolo o isopropanolo) devono essere considerati.

La situazione descritta nel caso c) è il metodo per valutare la qualità dell'acqua potabile in situazioni particolari, es focolai.

Il campionamento per l'esecuzione di analisi microbiologiche avviene in contenitore di vetro sterile o in contenitori monouso sterili con presenza di tiosolfato; nella Tabella A vengono riportate le quantità minime per l'esecuzione di parametri principali. Le bottiglie utilizzate per prelevare campioni per analisi microbiologiche, non devono mai essere sciacquate all'atto del prelievo. Il risciacquo oltre ad esporre la bottiglia a possibili contaminazioni, asporterebbe dalla bottiglia il tiosolfato presente. Assicurare che i campioni siano prelevati asetticamente usando mani pulite o guanti sterili con protezione del campione da flussi di aria canalizzati e spruzzi. Durante il riempimento, la parte interna della chiusura bottiglia non deve entrare in contatto con qualsiasi materiale.

Lasciare un po' di spazio d'aria nella bottiglia per consentire un'adeguata agitazione prima dell'analisi.

Chiudere immediatamente il flacone. Non utilizzare questo campione di acqua per la misura della temperatura o qualsiasi altro parametro in loco testato. Per dettagli, vedere ISO 5667-5.

6.1.1. Acqua di piscine

Per campionamento dopo filtri o sui tubi di alimentazione piscine, i rubinetti di campionamento dedicati devono essere disponibili, saldati a breve distanza sui tubi per evitare il ristagno. Riempire le bottiglie aprendo prima il rubinetto al flusso massimo per un tempo da 5 s a 10 s, quindi ridurre a metà flusso per il tempo necessario, e posizionare la bottiglia sotto il rubinetto senza chiudere e riaprire il rubinetto.

Per il campionamento del flusso dell'acqua nella piscina (dopo chiarificazione, trattamento e iniezione cloro) prendere il campione a una distanza dal punto di iniezione dove il residuo disinfettante sia stabile.

Campionamenti sotto la superficie dell'acqua (da -10 cm a -30 cm), utilizzare un'asta di campionamento opposta all'ingresso introducendo la bottiglia prima in orizzontale, per evitare di perdere tiosolfato, e poi in posizione verticale fino a riempimento.

6.1.2 Acque superficiali e di balneazione

Le acque di balneazione (laghi, fiumi, mare) sono di solito classificate dopo una serie di misurazioni, nel corso di una stagione. I punti di campionamento devono essere rigorosamente definiti.

I punti di campionamento devono essere rappresentativi della qualità dell'acqua nel sito utilizzato dalla maggior parte dei bagnanti, o in cui si prevede l'inquinamento, a seconda dello scopo del campionamento.

Centro Servizi e Tecnologie Ambientali	ISTRUZIONE OPERATIVA	Allegato 5 alla IOV-02
CAMPIONAMENTO_ ACQUE MICROBIOLOGIA		Rev. I
		Pag. 4 di 6

Prendere campioni sotto la superficie dell'acqua (da -20 cm a -30cm) in una colonna d'acqua profonda da 1 m a 1,5 m. Introdurre la bottiglia capovolta in acqua alla profondità di campionamento. Successivamente, riempire la bottiglia ruotandola lateralmente e verso l'alto, per evitare contaminazioni. Quando esiste una corrente a monte, tenere la bottiglia controcorrente.

In alcune spiagge, una colonna d'acqua di 1 m non è raggiunta e il campione necessita di essere preso a una profondità minore. Questo dovrebbe essere tenuto in considerazione e si dovrà fare particolare attenzione agli effetti di risospensione.

6.1.3 Acque reflue

Usare guanti monouso o aste sterilizzabili o pinze per campionamento sotto la superficie dell'acqua, per ridurre al minimo il rischio di infezione per il personale di campionamento. Rimuovere lo sporco dalle superfici esterne della bottiglia e/o metterli in sacchetti puliti e trasportarli separatamente dai campioni di acqua potabile. Le procedure di campionamento (dispositivi) di cui al 4.4.4.2 (laghi di mare, fiumi) sono applicabili.

6.2 Modalità per analisi microbiologiche

Il campionamento di acqua per analisi microbiologiche si suddivide in due tipologie che si differenziano a seconda dello scopo per il quale viene fatta la determinazione:

- **verificare le condizioni di utilizzo (ossia un campione istantaneo per simulare l'eventuale esposizione da parte di un utente):** il campionamento deve avvenire in condizioni di utilizzo, cioè senza scorrimento e senza flambatura o disinfezione.
- **verificare la qualità della rete idrica o del punto di distribuzione:**
il campionamento deve avvenire dopo le seguenti operazioni:
 - A) Flussare per almeno un minuto
 - B) Flambatura del terminale dove è possibile; in alternativa si procede con la disinfezione chimica lasciando almeno 60 secondi il prodotto in azione.
 - C) Dopo aver atteso il tempo di disinfezione far scorrere l'acqua per almeno un minuto per rimuovere l'eventuale residuo di disinfettante
 - D) Misurare la temperatura in uscita fino a temperatura pressoché costante
 - E) Procedere con il campionamento

In alternativa, su richiesta del cliente, il campionamento può essere eseguito senza flambatura o disinfezione segnalando tale metodologia nel verbale di campionamento.

6.3 Campionamento per determinazione Legionella

6.3.1 Principi generali

Legionella è un microrganismo con serbatoio nell'ambiente naturale. Esso tende facilmente a colonizzare le reti idriche, in particolare gli impianti termo-sanitari dell'acqua calda e gli impianti di condizionamento e raffreddamento. Una volta che *Legionella* si è insediata nell'impianto può trovare le condizioni adatte a proliferare, raggiungendo concentrazioni elevate (anche $> 10^4$ - 10^5 UFC/l) in grado di costituire un pericolo per l'uomo, il quale può infettarsi per via respiratoria mediante inalazione di aerosol di acqua contaminata (generati da torri di raffreddamento, soffioni delle docce, rubinetti, idromassaggi, strumenti per aerosol-terapia, sistemi di umidificazione dell'aria, ecc.). I fattori conosciuti che possono favorire la colonizzazione e lo sviluppo di *Legionella* nell'ambiente acquatico, naturale o artificiale, sono: le temperature comprese tra 25 e 42°C, la stagnazione, le incrostazioni, i biofilm ed i sedimenti e la presenza di alcune specie di amebe a vita libera in grado di ospitare e permettere la moltiplicazione del microrganismo in sede intracellulare.

La ricerca va quindi effettuata principalmente sugli impianti dell'acqua calda, prendendo in considerazione soprattutto i punti morti o a scarso deflusso ed i terminali della rete (es. docce, filtri rompigitto), le reti incrostate (es. calcare o biofilm), i depositi, gli eventuali ricircoli, ecc. Altri punti da prendere in considerazione sono gli impianti di condizionamento (condense, sifoni, aria), gli umidificatori (bacinelle raccolta acqua), i gorgogliatori (ossigeno). Ovviamente sarà indispensabile anche una verifica dell'approvvigionamento di acqua potabile.

Le strutture più direttamente interessate, sia per la complessità degli impianti che per la particolare vulnerabilità dei soggetti che ospitano, sono strutture sanitarie quali gli ospedali ed in particolare alcuni reparti come quelli per lungodegenti, per malati cronici o soggetti a rischio (es. geriatria, pediatria, infettivi, ematologia, oncologia, nefrologia, terapie immunosoppressive).

I campioni devono essere prelevati in quantità rappresentativa e sufficiente per le ricerche analitiche e sono individuabili in:

- acqua (prelevata ai terminali, ai punti intermedi o nei circuiti dell'acqua calda o di quella fredda)
- acqua di condensa o di umidificatori, acqua delle torri di raffreddamento, ecc.
- residui di incrostazioni o depositi (es. fanghi) (da prelevarsi con spatole, cucchiai o tamponi sterili)
- eventuali altri campioni ambientali (es. filtri di impianti di climatizzazione)

Le analisi vengono effettuate sui campioni tal quali e dopo concentrazione (di solito per filtrazione su membrana nel caso di acque) e semina su appositi terreni nutritivi e selettivi che, dopo il richiesto periodo di incubazione in condizioni idonee, vengono esaminati per la ricerca delle colonie tipiche o sospette, che vengono identificate mediante test biochimici e sierologici

6.3.2 Campionamento per determinazione Legionella

Quando necessario eseguire le operazioni di prelievo indossando gli appositi DPI in particolare mascherina ed occhiali.

Centro Servizi e Tecnologie Ambientali	ISTRUZIONE OPERATIVA	Allegato 5 alla IOV-02
CAMPIONAMENTO_ ACQUE MICROBIOLOGIA		Rev. I Pag. 5 di 6

Campionamento di acqua calda

Il volume consigliato per tale tipologia è di 1 litro; le modalità di prelievo sono le seguenti:

Per le modalità operative si rimanda al punto 6.1

Il campione va prelevato in appositi contenitori sterilizzati cui sia stata aggiunta una congrua quantità di sodio tiosolfato, per neutralizzare il cloro residuo. Per i campioni di acqua da circuiti idropotabili aggiungere, prima della sterilizzazione, una soluzione di Na₂S₂O₃ al 10% in ragione di 0,1 mL ogni 100 mL di capacità del contenitore.

Campionamento di acqua fredda

Procedere esattamente come nel caso di acqua calda; prelevare minimo 1L, ma visto che normalmente la concentrazione di legionella in acqua bassa temperatura è bassa, dove è possibile campionare una quantità di acqua maggiore.

Il campione va prelevato in appositi contenitori sterilizzati cui sia stata aggiunta una congrua quantità di sodio tiosolfato, per neutralizzare il cloro residuo. Per i campioni di acqua da circuiti idropotabili aggiungere, prima della sterilizzazione, una soluzione di Na₂S₂O₃ al 10% in ragione di 0,1 mL ogni 100 mL di capacità del contenitore.

Campionamenti da superfici umide con tamponi

Rimuovere il tampone dal contenitore sterile porre la punta del tampone sulla superficie che deve essere indagata e strisciare un'area di circa 20 /100 cmq mentre si ruota il tampone tra il pollice e l'indice in due direzioni ad angolo retto tra di loro.

Mettere il tampone nella provetta e rompere o tagliare il bastoncino.

Il campionamento va effettuato dopo attenta valutazione dell'impianto in modo tale da sceglierne i punti rappresentativi e più a rischio.

6.4 Parametri di campionamento

Per tutti i tipi di campionamento e per tutti i parametri è necessario registrare la temperatura dell'acqua tramite termometro a contatto o infrarossi.

6.5 Trasporto dei campioni

Le condizioni di trasporto sono fondamentali al fine di preservare le caratteristiche iniziali del campione.

Fra 0 °C e 45°C, le reazioni batteriche (velocità di moltiplicazione) sono proporzionali alla temperatura. Nel caso di eccessivo riscaldamento tuttavia la flora va incontro a morte. In batteriologia si assume un Q10 di 2; ciò significa che un incremento di temperatura di 10 °C aumenta la velocità di un fattore 2, sia in processi di moltiplicazione sia in processi di mortalità. E' quindi importante raffreddare i campioni durante il trasporto, ma senza congelarli, in quanto la formazione di ghiaccio può essere responsabile della morte della maggior parte delle cellule (> 99%).

Il trasporto al laboratorio va fatto il più presto possibile dopo il prelievo (per poter effettuare le analisi quanto prima) al riparo dalla luce e per acque fredde o a T ambiente all'interno di un contenitore isolante munito di panetti refrigeranti, in condizioni di temperatura tra 1°C ÷ 8°C, ed in presenza se necessario di un campione civetta prelevato dal frigo prima della partenza sul quale viene determinata la temperatura all'accettazione secondo quanto previsto dalla PG-02.

Evitare di mettere in contatto diretto il materiale refrigerante con il campione e regolare il numero di panetti in funzione del numero di campioni, massa e temperatura.

Per i campioni su cui eseguire la determinazione di Legionella il trasporto va eseguito a temperatura ambiente e consegnato al laboratorio entro le 24 ore da prelievo; se non immediatamente processato i campioni vanno conservati in frigo tra 2 – 8 °C.

Assicurare comunque un trasporto in contenitori termici isolati separati tra acque calde e fredde o a T ambiente.

7 PIANIFICAZIONE DEI CAMPIONAMENTI

Allo scopo di ottimizzare la gestione dei campionamenti è compito di RL o dell'operatore registrare sul sw gestionale "Teamup", le varie attività programmate al fine di permettere di decidere la suddivisione dei lavori

8 REGISTRAZIONI ED ARCHIVIAZIONE

Tutti i dati relativi al campionamento vanno registrati sul modulo MO/PG-02/01, e nel caso di campioni su cui eseguire esclusivamente il parametro "Legionella" MO/PG-02/06; in tali moduli si riporta la sigla identificativa del campione, il tipo di campione, il punto di prelievo e la zona di prelievo. Nel modulo vanno inserite tutte le informazioni relative alla quantità di campione, il contenitore, le informazioni di trasporto, la sigla delle AP utilizzate, il metodo di campionamento e informazioni in merito alle tipologie di analisi. La compilazione avviene attraverso all'inserimento di sigle ben precise riportate nel documento *DOC/000/01: Elenco delle matrici, delle prove e dei gruppi di prove*. *DOC/000/01: Elenco delle matrici, delle prove e dei gruppi di prove* oppure *DOC/000/04: Elenco delle matrici, delle prove e dei gruppi di prove (sintesi)*.

Sul sw gestionale "Teamup" RL o l'operatore deve inserire l'attività pianificata sul giorno previsto inserendo l'ipotesi di tempistiche, nome del cliente, operatore coinvolto ed eventuali altre informazioni utili.

Centro Servizi e Tecnologie Ambientali	ISTRUZIONE OPERATIVA	Allegato 5 alla IOV-02
CAMPIONAMENTO_ ACQUE MICROBIOLOGIA		Rev. 1 Pag. 6 di 6

8.1 Registros minime

Sui moduli MO/PG-02/01 e MO/PG-02/06 effettuare le registros previste ed in aggiunta:

- Data ed ora di campionamento;
- tipo di acqua campionata o la natura;
- volume di acqua campionata;
- precisa annotazione del punto di prelievo;
- la descrizione delle condizioni ambientali di conservazione, se di rilievo;
- qualunque osservazione possa risultare utile nella interpretazione dei risultati analitici;
- la temperatura.
- AP utilizzate per il prelievo
- Metodo di campionamento utilizzato

Tabella A

Prova	Matrice	Metodo	Contenitore	Quantità minima
CBT a 22°C e a 36°C	Acqua	UNI EN ISO 6222:2001	Vetro STERILE	100 mL
Coliformi totali	Acqua	APAT CNR IRSA 7010 Man 29 2003	Vetro STERILE	500 mL
Enterococchi (Streptococchi fecali)	Acqua	APAT- IRSA CNR Met. 7040 C, Man. 29/2003	Vetro STERILE	500 mL
Escherichia coli	Acqua	APAT CNR IRSA 7030 Man 29 2003	Vetro STERILE	200 mL
Legionella	Acqua	Doc 04/04/2000 GU n°103 del 05/05/00 all. 2	Vetro STERILE	1000 mL
Saggio di tossicità con Daphnia Magna	Acqua	UNI EN ISO 6341:1999	Vetro STERILE	1000 mL
Salmonella spp	Acqua	APAT CNR IRSA 7080 Man 29 2003	Vetro STERILE	200 mL