

INSES	<i>Estratto della PROCEDURA OPERATIVA N. 09</i>	Sigla documento: Estratti PO-09 Revisione: 14 Data: 08/08/2025 Pagina: 1 di 5
Titolo della procedura: <i>Campionamento e trasporto dei campioni - ACQUE</i>		

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

La presente procedura fornisce le informazioni necessarie per la corretta attività di campionamento e per le modalità più idonee alla loro conservazione durante il trasferimento al Laboratorio da parte del Personale qualificato INSES o del Cliente, qualora si occupi direttamente dell'esecuzione del campionamento.

Si applica al campionamento di alimenti, acque (in particolare quelle destinate al consumo umano), tamponi/spugne e piastre a contatto.

2. NORMATIVA DI RIFERIMENTO

- Rapporti ISTISAN 07/5 "Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi microbiologici"
- APAT/IRSA-CNR "Manuale e Linee Guida 29/2003"
- 79/CSR/2015 – Allegato 3 – "Linee guida per la prevenzione e il controllo della Legionellosi"
- DECRETO LEGISLATIVO 23 febbraio 2023, n. 18 Attuazione della direttiva (UE) 2020/2184 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2020, concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano. (23G00025) e successive modifiche ed integrazioni introdotte col DECRETO LEGISLATIVO 19 giugno 2025, n. 102 Disposizioni integrative e correttive del decreto legislativo 23 febbraio 2023, n. 18

3. CAMPIONAMENTO DI ACQUA DESTINATA AD USO UMANO PER ANALISI MICROBIOLOGICA

3.1 Campionamento

I volumi di acqua da prelevare vanno definiti in funzione dei parametri da determinare e comunque devono essere superiori al minimo necessario per procedere allo svolgimento degli esami richiesti.

Per le determinazioni microbiologiche sono richiesti almeno 1 litro di acqua in bottiglia sterile con tiosolfato (per acque clorate) o senza tiosolfato (per acque non clorate).

Il prelievo dei campioni microbiologici deve essere effettuato con recipienti sterili, a perfetta tenuta, di materiale idoneo (vetro borosilicato o materiale plastico); non possono essere usati contenitori metallici.

Poiché le acque destinate al consumo umano sono spesso disinfectate e contengono quindi tracce di cloro, le bottiglie per i prelievi devono contenere sodio tiosolfato in concentrazione idonea ad inibire l'azione del disinfectante.

La procedura di utilizzo del tiosolfato di sodio è la seguente: preparare una soluzione di sodio tiosolfato pentaaidrato allo 0,0250M (6.20 g di Na₂S₂O₃ * 5H₂O e sciogliere il contenuto in un matraccio da litro e portare a volume). Utilizzare 1,13 mL di soluzione standard di tiosolfato 0,0250 M per ogni milligrammo di cloro. Ad esempio, per un campione contenente 1 mg/L di cloro campionato in una bottiglia da 1000 mL utilizzare 1,13 mL della soluzione 0,0250 M.

Poiché non si può conoscere la quantità di cloro presente sul campione che si andrà a campionare, si ipotizza che non superi 1 mg/L (come tipicamente avviene nelle acque trattate); pertanto, si aliquoteranno 1,13 mL di sodio tiosolfato in bottiglie da 1000 mL, 0,565 mL in bottiglie da 500 mL, 0,283 mL in bottiglie da 250 mL.

Tale procedura non è applicabile ai Clienti che effettuano il campionamento e si consiglia l'utilizzo di bottiglie sterili contenenti sodio tiosolfato presenti in commercio. Per il campionamento di acque di sorgente, falda e pozzo non trattate si consiglia l'utilizzo di bottiglie sterili senza tiosolfato.

Le bottiglie/contenitori utilizzate per prelevare i campioni per analisi microbiologiche, non devono mai essere sciacquati all'atto del prelievo.

3.1.1 Pulizia e disinfezione del rubinetto

Prima del campionamento è opportuno rimuovere, se presenti, tubi di plastica e gomma ed eventuali filtri.

INSES	<i>Estratto della PROCEDURA OPERATIVA N. 09</i>	Sigla documento: Estratti PO-09 Revisione: 14 Data: 08/08/2025 Pagina: 2 di 5
Titolo della procedura: <i>Campionamento e trasporto dei campioni - ACQUE</i>		

Il rubinetto e il collo al suo interno devono essere puliti e devono essere eliminati depositi, polvere, mucillagini, sostanze grasse, detergenti o agenti disinfettanti e altre sostanze che possono avere influenza sui risultati dell'analisi microbiologica.

Per la pulizia possono essere utilizzate soluzioni al 10% di sodio ipoclorito commerciale.

Una volta lavato il rubinetto con la soluzione disinfettante, lasciare agire il disinfettante per 2-3 minuti; sciacquare l'esterno con acqua per assicurarsi che non ci siano più residui di disinfettante e aprire quindi il rubinetto facendo scorrere l'acqua per un tempo sufficiente a far sì che i disinfettanti vengano eliminati prima della raccolta del campione.

L'operazione di flambatura del rubinetto, solo supplementare alla pulizia e disinfezione, comunque obbligatorie, può essere effettuata solo su rubinetti metallici. Eseguire il prelievo dopo aver fatto scorrere dal rubinetto l'acqua per 1-3 minuti evitando di modificare la portata del flusso durante la raccolta del campione.

3.1.2 Esecuzione del prelievo

All'atto del prelievo, aprire la bottiglia sterile avendo cura di non toccare la parte interna del tappo che andrà a contatto con il campione prelevato, né l'interno del collo della bottiglia e provvedere all'immediata chiusura della stessa subito dopo il prelievo, avendo cura di non riempirla completamente al fine di consentire una efficace omogeneizzazione del campione, in Laboratorio, al momento dell'analisi.

Se il prelievo viene effettuato per immersione, la bottiglia o il contenitore devono essere sterilizzati avvolti in fogli protettivi. All'atto del prelievo, dopo avere liberato dall'involucro la bottiglia, la superficie esterna che entrerà in contatto con il campione non deve mai essere toccata con le mani, bensì la bottiglia deve essere afferrata con una pinza sterile o con altro analogo idoneo sistema.

3.1.3 Identificazione del campione

Il campione prelevato deve essere accompagnato da tutte le indicazioni necessarie alla sua identificazione:

- data e ora del campionamento
- tipo di acqua
- punto di prelievo

e qualunque altra osservazione possa risultare utile nella interpretazione dei risultati di Laboratorio.

3.2 Trasporto e conservazione del campione

Il campione deve essere protetto sia dalla luce, sia dalle alte temperature e deve essere trasportato in Laboratorio in idonee condizioni igieniche. Inoltre durante il trasporto le bottiglie devono essere collocate nel contenitore in modo da impedire il loro rovesciamento e fra esse devono essere collocati idonei sistemi di separazione per evitare roture.

Il trasporto dei campioni deve avvenire ad una temperatura di 4-10°C.

Al fine di consentire il mantenimento della temperatura del campione nel range consigliato, è necessario usare, per il trasporto, frigobox che contengano piastre eutetiche, evitando comunque il congelamento del campione. Utilizzare un termometro di min-max (oppure un data logger) per la verifica del mantenimento della temperatura durante il trasporto. La registrazione della temperatura di trasporto viene riportata nel mod. 49 durante la fase di campionamento.

In fase di accettazione dei campioni, il Laboratorio reputa conforme il range di temperatura di 4-10°C.

Qualora il tempo intercorso dal campionamento sino al momento di arrivo del campione in laboratorio sia pari o inferiore a 2 ore, il range di temperatura di accettazione si estende a 4-15°C.

I campioni di acqua devono essere esaminati nel minor tempo possibile.

INSES	<i>Estratto della PROCEDURA OPERATIVA N. 09</i>	Sigla documento: Estratti PO-09 Revisione: 14 Data: 08/08/2025 Pagina: 3 di 5
Titolo della procedura: <i>Campionamento e trasporto dei campioni - ACQUE</i>		

Fermo restando che il tempo che intercorre tra prelievo e analisi del campione, indipendentemente dalla sua natura, deve essere il più breve possibile, nel caso di acque destinate al consumo umano, corre l'obbligo di non superare le 24 ore.

3.3 Campionamento di acque e campioni ambientali destinati alla ricerca di Legionella

Le operazioni di campionamento vanno eseguite osservando le precauzioni necessarie alla tutela della salute dell'operatore, con utilizzo di mascherine, guanti, occhiali ecc.

I campioni sono rappresentati da:

- Acqua del circuito dell'acqua calda e di quello dell'acqua fredda qualora la temperatura sia superiore a 20 °C;
- Depositi (cosiddetti "fanghi") da serbatoi e altri punti di raccolta dell'acqua;
- Incrostazioni da tubature e serbatoi;
- Tamponi utilizzati per raccogliere biofilm e altro materiale adeso alle pareti di tubature, sbocco di rubinetti, interno del bulbo delle docce;
- Acqua di condensa e acqua di sifoni ed altre parti degli impianti dell'aria condizionata e di umidificazione;
- Acqua proveniente da sgocciolamento delle torri di raffreddamento;
- Filtri da impianti di climatizzazione.

3.3.1 Modalità di prelievo

Acqua: il volume consigliabile è di almeno 1 litro, quando possibile. L'acqua viene raccolta in recipienti sterili. Nel caso essa contenga cloro sarà opportuno aggiungere sodio tiosolfato ad una concentrazione finale di 0.01%.

- Per la ricerca di *Legionella* in condizioni di utilizzo comune, prelevare, preferibilmente dal circuito dell'acqua calda, senza flambarie al punto di sbocco e senza far scorrere precedentemente l'acqua.
- Per una ricerca quantitativa di *Legionella* nell'acqua all'interno dell'impianto, prelevare dopo aver fatto scorrere l'acqua per 5 – 10 minuti, flammando allo sbocco

Depositi: prelevare dallo scarico, oppure dal fondo della raccolta di acqua dopo aver eliminato l'acqua dall'alto. Raccogliere in recipienti sterili.

Incrostazioni: prelevare da tubature e serbatoi, staccando meccanicamente il materiale depositatosi all'interno. Raccogliere in recipienti sterili.

Tamponi: Con un tampone sterile raccogliere il materiale depositato sulle superfici interne. Conservare il tampone in una provetta con tappo a vite, contenente circa 2 ml di acqua dell'impianto.

Filtri: Prelevare il filtro e conservarlo in un sacchetto di materiale plastico.

3.3.2 Trasporto e conservazione

I campioni prelevati devono essere consegnati al Laboratorio il prima possibile affinché l'analisi possa essere iniziata entro le 24 ore dal prelievo e trasportati a temperatura ambiente al riparo dalla luce, avendo cura di separare i campioni di acqua calda da quelli di acqua fredda.

Se la consegna al Laboratorio non avviene entro 24 ore dal prelievo, i campioni devono essere conservati necessariamente a temperatura di $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e trasportati alla medesima temperatura affinché l'analisi possa essere effettuata il più presto possibile e comunque **non oltre** i 4 giorni dal prelievo.

INSES	<i>Estratto della PROCEDURA OPERATIVA N. 09</i>	Sigla documento: Estratti PO-09 Revisione: 14 Data: 08/08/2025 Pagina: 4 di 5
Titolo della procedura: <i>Campionamento e trasporto dei campioni - ACQUE</i>		

4. CAMPIONAMENTO DI ACQUA DESTINATA AD USO UMANO PER ANALISI CHIMICHE

4.1 Recipienti per la raccolta e il trasporto del campione

I contenitori utilizzati per la raccolta e il trasporto del campione non devono alterare il valore di quei parametri di cui deve essere effettuata la determinazione, in particolare:

1. non devono cedere o adsorbire sostanze, alterando la composizione del campione;
2. devono essere resistenti ai vari costituenti presenti nel campione;
3. devono garantire la perfetta tenuta, anche per i gas disciolti e per i composti volatili, ove questi siano oggetto di determinazione analitica.

I materiali consigliati per i contenitori sono il vetro (Pyrex) o polietilene. Le bottiglie, i contenitori (tappo e sottotappo compresi) devono essere perfettamente puliti. E' preferibile l'impiego di contenitori nuovi ma è consentito anche il riutilizzo dei contenitori purché perfettamente lavati e precedentemente impiegati soltanto per campionamenti di acque destinate al consumo umano.

4.2 Campionamento

Il volume necessario del campione dipende dalle determinazioni da eseguire e dal metodo di analisi impiegato.

In linea generale per le determinazioni chimiche è richiesto almeno 1 litro di acqua in bottiglia non sterile (eventuali vials devono essere completamente riempite senza spazio di testa), il volume può variare in base al numero di determinazioni.

All'atto del prelievo sciacquare la bottiglia con l'acqua da campionare quindi procedere al riempimento del contenitore. Si consiglia di prelevare quantità di campione in eccesso.

Qualora si renda necessario evitare il contatto del campione con l'aria o si debbano analizzare sostanze volatili, si utilizzano per il campionamento contenitori in vetro con tappo a vite con guarnizione a tenuta (vials). Si riempie il contenitore fino all'orlo avendo l'accortezza di verificare che non rimangano bolle d'aria nel contenitore. Questa accortezza impedisce il trasferimento degli analiti nello spazio di testa e la loro perdita all'atto dell'apertura dei contenitori.

4.2.1 Identificazione del campione

Il campione prelevato deve essere accompagnato da tutte le indicazioni necessarie alla sua identificazione:

- data e ora del campionamento
- tipo di acqua
- punto di prelievo

e qualunque altra osservazione possa risultare utile nella interpretazione dei risultati di Laboratorio.

4.3 Trasporto del campione

Dal momento del campionamento il campione inizia a modificarsi fisicamente, chimicamente e biologicamente.

Il campione deve essere protetto sia dalla luce, sia dalle alte temperature e deve essere trasportato in Laboratorio refrigerato facendo attenzione a non danneggiare i contenitori.

Per quanto riguarda i tempi massimi intercorrenti tra il prelievo e l'analisi è raccomandabile eseguire sempre le analisi sul campione, il più presto possibile dopo la raccolta (si consiglia un tempo non superiore alle 24 ore).

INSES	<i>Estratto della PROCEDURA OPERATIVA N. 09</i>	Sigla documento: Estratti PO-09 Revisione: 14 Data: 08/08/2025 Pagina: 5 di 5
Titolo della procedura: <i>Campionamento e trasporto dei campioni - ACQUE</i>		

5. CAMPIONAMENTO DI ACQUA REFLUA

5.1 Campionamento MICROBIOLOGICO

Il prelievo dei campioni per l'esame microbiologico deve essere effettuato con recipienti puliti e sterili di capacità adeguata; per la sola determinazione del E. Coli sono sufficienti contenitori da 250ml, per più determinazioni si valuta al momento della programmazione del prelievo. Poiché il rischio di contaminazione del campione diminuisce quanto più sono inquinate le acque da controllare, il prelievo di campioni per la caratterizzazione e/o il controllo delle acque reflue è meno problematico anche se, in questo caso, è necessario osservare norme igieniche di sicurezza a tutela della salute dell'operatore.

5.2 Campionamento CHIMICA

Sono previste le seguenti modalità di esecuzione dei prelievi:

- **Prelievo istantaneo:** per campionamento "istantaneo" si intende il prelievo di un singolo campione in un'unica soluzione in un punto determinato ed in un tempo molto breve, immergendo il contenitore direttamente nel refluo, se possibile. Il prelievo istantaneo è da utilizzarsi nelle seguenti circostanze: a) Scarico non continuo b) Scarico di acque di prima/seconda pioggia; c) Scarico anomalo; d) In caso di mancanza dei requisiti per l'installazione dell'autocampionatore; e) In caso di malfunzionamento dell'autocampionatore; f) Nel caso che a monte del pozzetto campionatore sia presente una vasca di equalizzazione con una capacità di almeno 3 ore. Il prelievo viene effettuato se all'interno del pozzetto è presente una quantità sufficiente di liquidi tali da consentire la formazione delle aliquote di campione destinate alle analisi
- **Prelievo medio composito sulle 3 ore:** è previsto l'impiego di SAP = [Sistemi automatici di prelievo] presenti negli impianti in cui si deve campionare, oppure il prelievo può essere fatto manualmente dall'operatore effettuando campionamenti ogni 30 minuti per un totale di sei campionamenti nell'arco delle tre ore ogni prelievo deve essere almeno di un litro di acqua campionata. Al termine dei campionamenti gli stessi verranno svuotati in un contenitore capace di contenere tutto il quantitativo di campioni prelevati in modo tale da rendere un campione omogeneo. Dal contenitore si preleva un quantitativo di almeno 2 litri per le analisi
- **Prelievo medio composito sulle 24 ore:** è previsto l'impiego di SAP = [Sistemi automatici di prelievo] presenti negli impianti in cui si deve campionare. Al termine delle 24 ore gli stessi verranno svuotati in un contenitore capace di contenere tutto il quantitativo di campioni prelevati in modo tale da rendere un campione omogeneo. Dal contenitore si preleva un quantitativo di almeno 2 litri per le analisi

Altre modalità possono essere adottate per motivate ragioni da giustificare nel Verbale di campionamento.

Per quanto riguarda la procedura di esecuzione del campionamento e trasporto del campione, si procede secondo quanto riportato sopra per le acque destinate al consumo umano, sia per analisi l'microbiologica che chimica.

L'intervallo di temperatura di accettazione del campione all'arrivo in laboratorio è compreso tra 4-10°C.

6. INFORMAZIONI ULTERIORI PER I CLIENTI

Il personale del Laboratorio, su richiesta, fornisce il materiale necessario per il campionamento ed è a disposizione per qualsiasi informazione a riguardo.

Per parametri analitici non considerati nella presente procedura, chiamare sempre il Laboratorio ed accertarsi delle modalità di campionamento e della quantità di campione da prelevare.