

INDAM LABORATORI SRL	Allegato G RIFERIMENTO PROCEDURA: PG 111	PAG. 1 DI 7
CASTELMELLA (BS)	TITOLO CAMPIONAMENTO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DI CAMPIONI PER LA DETERMINAZIONE DI LEGIONELLA	REV. N° 7 DATA 07/04/2021
CLASSIFICAZIONE	N° DI REGISTRAZIONE Allegato G	EMESSO DA RAQ

1. SCOPO

La presente procedura descrive le modalità operative per il campionamento di tutte le tipologie di acqua (acqua destinata al consumo umano, industriale, di scarico e naturale) e di matrici legate all'acqua (biofilm), sedimenti, incrostazioni, depositi, filtri, fanghi da serbatoi, ecc per la determinazione di Legionella.

2. RIFERIMENTI

- **ISO 11731:2017**
- **79/CSR/2015**
- **ISO 19458:2006**

3. CAMPO DI APPLICAZIONE

I campioni sono rappresentati principalmente da:

- acqua del circuito dell'acqua sanitaria calda e fredda, soprattutto se la temperatura è superiore a 20°C;
- acqua d'umidificazione degli impianti aeraulici;
- acqua degli impianti di raffreddamento a torri evaporative/condensatori evaporativi; filtri da impianti di climatizzazione;
- aria umidificata (ad es. quella che fuoriesce dalle torri evaporative/condensatori evaporativi)
- acqua da vasche idromassaggio, fontane decorative;
- acqua da sistemi per la respirazione assistita, aerosol;
- acqua e altre matrici tipiche di stabilimenti termali.
- depositi (cosiddetti "fanghi") o sedimenti da serbatoi e altri punti di raccolta dell'acqua;
- incrostazioni da tubature e serbatoi;
- biofilm e/o altro materiale attaccato alle superfici interne delle tubazioni, allo sbocco di rubinetti, nei filtri rompigitto, all'interno del diffusore delle docce effettuando la raccolta con l'utilizzo di tamponi;

4. REQUISITI DEL PERSONALE ABILITATO AL CAMPIONAMENTO

Il personale tecnico che preleva i campioni non deve appartenere ad una categoria a rischio (persone che sono sottoposte a trattamento con corticosteroidi, che abbiano affezioni croniche a carico dell'apparato respiratorio, diabetici, ecc).

Il personale abilitato al campionamento:

- indossa, quando necessario (ad esempio in campionamenti in cui non è possibile lo spegnimento di torri di raffreddamento che determinano, nei confronti del campionario, un'esposizione a rischio) dispositivi di protezione individuale DPI (guanti, maschera facciale con filtro polivalente combinato oppure maschera con filtro FFP3 e occhiali)
- minimizza la formazione di aerosol facendo scorrere l'acqua delicatamente dall'erogatore oggetto di campionamento
- evita l'esposizione ad aerosol
- ove praticabile e necessario, richiede la disattivazione delle torri di raffreddamento o dei condensatori evaporativi, almeno 20 minuti prima di effettuare il campionamento.

INDAM LABORATORI SRL	Allegato G RIFERIMENTO PROCEDURA: PG 111	PAG. 2 DI 7
CASTELMELLA (BS)	TITOLO CAMPIONAMENTO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DI CAMPIONI PER LA DETERMINAZIONE DI LEGIONELLA	REV. N° 7 DATA 07/04/2021
CLASSIFICAZIONE	N° DI REGISTRAZIONE Allegato G	EMESSO DA RAQ

5. MATERIALE OCCORRENTE PER IL CAMPIONAMENTO

Materiale occorrente:

- dispositivi di protezione individuale DPI (guanti, maschera facciale con filtro polivalente combinato oppure maschera con filtro FFP3 e occhiali)
- Borsa isoterma per il trasporto dei campioni
- Bottiglie sterili con capacità minima di 1 L di polipropilene (PP), contenenti una concentrazione di tiosolfato di sodio pentaidrato (come indicato nella norma UNI EN ISO19458 al punto 4.2.3), quando sappiamo che potrebbe essere stato utilizzato cloro come sistema di disinfezione, altrimenti se il sistema di disinfezione utilizza ioni rame o argento si neutralizza con EDTA (vedi ISO 19458)
- Contenitori in vetro o polietilene sterili per la raccolta di depositi e incrostazioni
- Buste di plastica sterili per convogliare il flusso della doccia
- Tamponi sterili (cotone, poliestere o altro materiale)
- Bisturi sterili
- Termometro tarato, preferibilmente digitale con sensibilità 0,1 °C
- Flambatore
- Pennarelli resistenti all'acqua o etichette
- Pinze sterili
- Elastici
- Forbici
- Torcia elettrica
- Alcool isopropilico (propanolo) 70% spray (IPASEPT 70).

6. MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO

E' importante adottare appropriate precauzioni per eliminare cross-contaminazione tra i siti di campionamento, specialmente quando si raccolgono campioni ad immersione (serbatoi, bacini di raccolta delle torri di raffreddamento).

Ad esempio cambiare i guanti ogni volta che si effettua un campionamento ad immersione, alternativamente le mani dell'operatore devono essere disinfettate con alcool isopropilico (propanolo) o etanolo al 70% v/v.

Anche la superficie esterna delle bottiglie non deve essere contaminata. Se c'è qualsiasi dubbio in proposito, la bottiglia deve essere eliminata o disinfettata esternamente con alcool isopropilico (propanolo) o etanolo al 70% v/v prima dell'uso.

INDAM LABORATORI SRL	Allegato G RIFERIMENTO PROCEDURA: PG 111	PAG. 3 DI 7
CASTELMELLA (BS)	TITOLO CAMPIONAMENTO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DI CAMPIONI PER LA DETERMINAZIONE DI LEGIONELLA	REV. N° 7 DATA 07/04/2021
CLASSIFICAZIONE	N° DI REGISTRAZIONE Allegato G	EMESSO DA RAQ

7. MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO ACQUA CALDA E ACQUA FREDDA DA IMPIANTI IDROTERMOSANITARI

Acqua calda

Il volume consigliabile è di almeno 1 litro.

Per la determinazione di Legionella, in condizioni di utilizzo comune (ossia un campione istantaneo per simulare l'eventuale esposizione da parte di un utente), prelevare senza flambare o disinfettare al punto di sbocco e senza far scorrere precedentemente l'acqua e misurare la temperatura.

Per una determinazione di Legionella all'interno dell'impianto (ossia per monitorarne le sue condizioni d'igiene):

- far scorrere l'acqua per almeno un minuto;
- chiudere il flusso e flambare all'interno e all'esterno dello sbocco, (quando la flambatura è tecnicamente possibile) oppure disinfettare con ipoclorito al 1% o etanolo al 70% lasciando agire il disinfettante almeno per 60 secondi;
- fare scorrere l'acqua ancora per almeno 1 minuto per rimuovere l'eventuale disinfettante;
- misurare la temperatura ponendo il termometro nel flusso d'acqua e aspettando il tempo necessario affinché raggiunga un valore pressoché costante;
- prelevare il campione.

Si suggerisce l'applicazione di questa modalità di campionamento in occasione dell'esecuzione dei monitoraggi microbiologici di autocontrollo di routine.

Acqua fredda

Per la determinazione di Legionella in condizioni di utilizzo comune prelevare senza flambare o disinfettare al punto di sbocco e senza far scorrere precedentemente l'acqua e misurare la temperatura ponendo il termometro al centro del flusso.

Per la determinazione di Legionella nell'acqua all'interno dell'impianto di acqua fredda il campione si può prelevare seguendo quanto è stato descritto per l'acqua calda.

Se la temperatura dell'acqua nell'impianto è $\leq 20^{\circ}\text{C}$ il numero di campioni può essere ridotto.

7.1 Punti di campionamento

La definizione di quali e quanti punti di controllo sottoporre a campionamento deve essere motivata dalla valutazione del rischio legionellosi, così come la frequenza d'esecuzione di tali controlli analitici.

Il percorso dell'acqua dovrebbe essere monitorato dal suo punto di partenza (punto di alimento idrico della rete, ossia dall'allacciamento all'acquedotto od al punto d'emungimento d'acqua di pozzo) fino ai terminali di utilizzo (erogatori sentinella).

A seguire, si riporta l'elenco dei principali punti di controllo, da utilizzarsi come riferimento per la definizione della più opportuna mappatura analitica della rete idrica oggetto d'indagine:

- allacciamento all'acquedotto od al punto d'emungimento d'acqua di pozzo
- accumuli acqua fredda destinata al consumo umano, serbatoi/bollitori acqua calda sanitaria (alla base e ad 1/3 dell'altezza, quando possibile)
- tutti i siti in cui possono essere presenti fenomeni di ristagno, sedimentazione od incrostazioni significative
- utenze poco utilizzate
- ricircolo dell'acqua calda sanitaria (anello di distribuzione)
- erogatori a servizio di bagni e/o docce distali (erogatori sentinella)
- addolcitori

INDAM LABORATORI SRL	Allegato G RIFERIMENTO PROCEDURA: PG 111	PAG. 4 DI 7
CASTELMELLA (BS)	TITOLO CAMPIONAMENTO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DI CAMPIONI PER LA DETERMINAZIONE DI LEGIONELLA	REV. N° 7 DATA 07/04/2021
CLASSIFICAZIONE	N° DI REGISTRAZIONE Allegato G	EMESSO DA RAQ

8. MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO IMPIANTI DI RAFFREDDAMENTO A TORRI EVAPORATIVE / CONDENSATORI EVAPORATIVI

Di seguito riportiamo le indicazioni estrapolate da **“Linee guida per la prevenzione della Legionella nelle torri di raffreddamento” a cura di ATS Brescia (Versione n°1 – Dicembre 2018)**.

Per effettuare i campionamenti nei punti indicati al momento del campionamento è richiesta la presenza / assistenza del manutentore o dell'idraulico che conosca l'impianto e la verifica dell'accessibilità dei punti di prelievo .

Monitoraggio e frequenza in riferimento alla contaminazione da Legionella:

- Legionella - frequenza: TRIMESTRALE
- Carica batterica totale – Frequenza: SETTIMANALE

Essendo la misurazione della presenza di Legionella un'attività di laboratorio che richiede diversi giorni di attesa, si suggerisce di valutare l'ipotesi di mantenere monitorata anche la carica batterica totale. Al riguardo le linee guida **“European Technical Guidelines for the Prevention , Control and Investigation, of Infections caused by Legionella species” (Tabella 4 - Action levels following microbial monitoring for cooling towers)** associano alle concentrazioni di carica batterica totale i livelli di azione previsti.

I punti di prelievo devono tener conto delle specifiche impiantistiche, delle caratteristiche dei flussi, devono essere di facile accesso, devono essere identificati e stabiliti in modo da assicurare la ripetibilità del campionamento nel tempo.

Il campionamento deve essere eseguito senza modificare le normali condizioni di esercizio che possano falsare il risultato delle analisi (non devono prevedere smontaggi o interventi su parti dell'impianto). Specificare sul verbale di prelievo le condizioni di esercizio (fermo/ in ripartenza/ in marcia ecc.)

Un punto di prelievo deve essere situato nel bacino di raccolta di ciascun impianto di raffreddamento il più lontano possibile dalle pompe (zona tranquilla).

9. MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO DEPOSITI O SEDIMENTI

Prelevare dallo scarico oppure dal fondo della raccolta di acqua, una quantità > 5ml dopo aver eliminato l'acqua dall'alto. Raccogliere in recipienti sterili di vetro o altro materiale monouso.

10. MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO INCROSTAZIONI

Prelevare da tubature e serbatoi, staccando meccanicamente con bisturi sterile il materiale depositatosi all'interno. Raccogliere in recipienti sterili di vetro o altro materiale monouso contenente una piccola quantità (2-5 ml) di soluzione Ringer o Page o acqua sterile o soluzione neutralizzante

11. MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO BIOFILM

Con un tampone sterile raccogliere il materiale depositato sulle superfici interne o esterne del punto terminale (effettuare il prelievo prima di aprire il flusso d'acqua, dopo aver smontato il rompi getto o il diffusore della doccia).

INDAM LABORATORI SRL	Allegato G RIFERIMENTO PROCEDURA: PG 111	PAG. 5 DI 7
CASTELMELLA (BS)	TITOLO CAMPIONAMENTO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DI CAMPIONI PER LA DETERMINAZIONE DI LEGIONELLA	REV. N° 7 DATA 07/04/2021
CLASSIFICAZIONE	N° DI REGISTRAZIONE Allegato G	EMESSO DA RAQ

Conservare il tampone in recipiente di vetro o altro materiale monouso (provetta) con tappo, contenente una piccola quantità (2-5 ml) di soluzione Ringer o Page o acqua sterile o soluzione neutralizzante

12. MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO FILTRI

Il controllo deve essere eseguito su filtri utilizzati da diverso tempo, e non su quelli lavati o sostituiti di recente.

Prelevare il filtro o una porzione di esso se è di grandi dimensioni e conservarlo in un sacchetto di plastica sterile.

13. MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO RIUNITI ODONTOIATRICI

Come indicato da Laboratorio Nazionale di riferimento per le legionelle (Dipartimento di Malattie Infettive Parassitarie ed Immuno-mediate Istituto Superiore di Sanità) il campionamento può essere effettuato, miscelando circa 200 ml di acqua, per un totale di 1 litro, proveniente da ciascuno dei seguenti punti:

- . siringa aria-acqua
- . micromotore
- . turbina
- . ablatore e bicchiere

(Convegno ACCREDIA del 10 maggio 2016 - strumenti per la prevenzione e il controllo di Legionella e Salmonella per i laboratori di prova.)

14. CAMPIONAMENTO NELLE STRUTTURE TURISTICO-RICETTIVE

Per le strutture a funzionamento stagionale, il campionamento dovrà, comunque, essere **sempre** effettuato prima della loro riapertura.

Il campionamento deve essere effettuato prima che venga attuato un qualunque intervento di disinfezione o pratica preventiva (pulizia e/o disinfezione con qualunque metodo) oppure a distanza di un tempo congruo dalla sua esecuzione (rif. dopo circa 48 ore dall'avvenuta messa a regime dell'impianto post intervento).

E' opportuno che il numero di campioni sia proporzionato alle dimensioni dell'impianto.

Per ciascun impianto di acqua calda sanitaria devono essere effettuati almeno i seguenti prelievi:

- mandata (oppure dal rubinetto più vicino al serbatoio/i)
- ricircolo
- fondo serbatoio/i
- almeno 3 punti rappresentativi (ovvero i più lontani nella distribuzione idrica e i più freddi)

Per ciascun impianto di acqua fredda devono essere effettuati almeno i seguenti prelievi:

- fondo serbatoio/i
- almeno 2 in punti rappresentativi (ovvero il più lontano nella distribuzione idrica ed il più caldo).

15. CAMPIONAMENTO NELLE VASCHE IDROMASSAGGIO

INDAM LABORATORI SRL	Allegato G RIFERIMENTO PROCEDURA: PG 111	PAG. 6 DI 7
CASTELMELLA (BS)	TITOLO CAMPIONAMENTO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DI CAMPIONI PER LA DETERMINAZIONE DI LEGIONELLA	REV. N° 7 DATA 07/04/2021
CLASSIFICAZIONE	N° DI REGISTRAZIONE Allegato G	EMESSO DA RAQ

Per vasche idromassaggio si intendono vasche o piscine di piccole o grandi dimensioni in cui l'acqua calda viene continuamente fatta ricircolare attraverso getti ad alta velocità. La temperatura dell'acqua è generalmente superiore ai 30°C e l'agitazione a cui è sottoposta genera un aerosol sopra la superficie dell'acqua.

L'acqua non viene cambiata dopo ogni utilizzatore, ma viene filtrata e trattata chimicamente.

Il campionamento per la determinazione di Legionella dovrebbe essere effettuato una volta ogni 3 mesi,

raccogliendo 1 L d'acqua dalla piscina e, se presente, dalla vasca di compenso.

E' anche importante ispezionare le tubature e i tubi di circolazione dell'aria e dell'acqua per la presenza di biofilm contenente Legionella. Campioni di biofilm devono essere raccolti con tamponi dall'interno dei getti e alcune sezioni di questi tubi.

Talvolta è possibile farlo rimuovendo un getto, ma molto spesso sezioni di tubo dovrà essere tagliato per ottenere l'accesso adeguato.

16. CAMPIONAMENTO STABILIMENTI TERMALI

Gli stabilimenti e gli alberghi termali, in ambienti diversi da quelli dedicati alle cure, da anni ormai integrano l'offerta delle prestazioni terapeutiche con quelle più propriamente di benessere. Le prestazioni comprendono: bagni con idromassaggio, docce filiformi, "docce francesi", bagno turco, sauna, fanghi, massaggi, piscine con zone con idromassaggio, ecc. Le caratteristiche della microflora tipica delle acque termali ed il fatto che queste le apparecchiature/le cure termali per le quali maggiore è il rischio di trasmissione possono essere:

- cure inalatorie (inalazioni, aerosol-humages, nebulizzazioni, docce nasali), sia per le caratteristiche delle apparecchiature utilizzate che per la tipologia degli utenti (soggetti a rischio per patologie croniche dell'apparato respiratorio);
- bagni con idromassaggio;
- docce d'annettamento (se previste).

17. CAMPIONAMENTO NELLE STRUTTURE SANITARIE

I reparti che ospitano pazienti profondamente immunocompromessi (trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche, trapianto di organo solido) devono avere impianti privi di Legionella.

Inoltre in questi reparti deve essere eseguito un campionamento ambientale almeno **trimestrale** per controllare l'assenza di colonizzazione con Legionella.

E' opportuno che il numero di campioni sia proporzionato alle dimensioni dell'impianto.

Per ciascun impianto di **acqua calda sanitaria** devono essere effettuati almeno i seguenti prelievi:

- mandata (oppure dal rubinetto più vicino al serbatoio/i)
- ricircolo
- fondo serbatoio/i
- almeno 3 punti rappresentativi (ovvero i più lontani nella distribuzione idrica e i più freddi).
- Per strutture con numero di posti letto superiore a 150, considerare almeno un punto di prelievo aggiuntivo ogni 100 posti letto in più.

Per ciascun **impianto di acqua fredda** devono essere effettuati almeno i seguenti prelievi:

- fondo serbatoio/i
- almeno 2 in punti rappresentativi (ovvero il più lontano nella distribuzione idrica ed il più caldo).

INDAM LABORATORI SRL	Allegato G RIFERIMENTO PROCEDURA: PG 111	PAG. 7 DI 7
CASTELMELLA (BS)	TITOLO CAMPIONAMENTO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DI CAMPIONI PER LA DETERMINAZIONE DI LEGIONELLA	REV. N° 7 DATA 07/04/2021
CLASSIFICAZIONE	N° DI REGISTRAZIONE Allegato G	EMESSO DA RAQ

→ Per strutture con numero di posti letto superiore a 150, considerare almeno un punto di prelievo aggiuntivo ogni 100 posti letto in più.

18. TRASPORTO E CONSERVAZIONE

I campioni prelevati devono essere consegnati il prima possibile affinché l'analisi possa essere iniziata entro le 24 ore dal prelievo e trasportati preferibilmente alla temperatura di $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (è accettabile il trasporto a temperatura ambiente), al riparo dalla luce, avendo cura di separare i campioni di acqua calda da quelli di acqua fredda.

Le condizioni di trasporto sono monitorate in fase di accettazione dei campioni.

Le responsabilità derivanti dal campionamento, conservazione e consegna del campione eseguiti da terzi (clienti inclusi), sono a loro totale carico.

Nel caso in cui il campione risulti alla verifica non conforme ai requisiti sopraindicati viene informato il cliente, che può decidere se proseguire con l'analisi o annullare il campione.

Qualora il cliente decida di procedere ugualmente è richiesta comunicazione/conferma scritta.

Gli scostamenti vengono registrati e nel rapporto di prova viene indicato quali risultati possono essere stati influenzati dallo scostamento, viene inoltre inserita la dichiarazione in cui il laboratorio declina ogni responsabilità.