

Modulo 18 Isolamento e quantificazione di *Legionella* in campioni ambientali

Questo modulo presenta alcuni aspetti dei quali bisogna tenere conto quando si effettuano dei prelievi ambientali per delle analisi. Per quanto concerne il metodo d'analisi, la procedura completa e accreditata è descritta nella norma ISO 11731. Il Centro Nazionale di Referenza per *Legionella* può essere sollecitato per analizzare dei campioni ed è a disposizione dei laboratori che desiderano delle informazioni pratiche complementari.

1. Campionamento

Esiste una controversia riguardo alle modalità di prelievo, per cui proponiamo qui diverse tecniche. Per poter controllare l'efficacia delle misure adottate, è molto importante stabilire un protocollo esatto e utilizzare sempre la stessa tecnica per le analisi di controllo (riproducibilità).

Punti di prelievo

1.1. Per l'acqua sanitaria.- I luoghi più soggetti alla proliferazione batterica sono i rubinetti, le docce e la parte inferiore dei serbatoi. I punti di prelievo dovrebbero essere rappresentativi dell'intero sistema. Il numero di campioni varia in funzione della situazione. Abitualmente i punti rappresentativi e i punti critici sono determinati da persone con conoscenze approfondite delle installazioni. Per esempio, nel caso particolare degli ospedali è l'équipe di prevenzione e controllo delle infezioni in collaborazione con il servizio tecnico, che determina il numero di campioni, il tipo (quantitativo e/o qualitativo) e la loro localizzazione. In generale se è tecnicamente possibile, è preferibile raccogliere:

- un campione d'acqua fredda all'entrata nell'edificio
- un campione di acqua calda all'uscita dal bollitore
- un campione di acqua calda al ritorno nel bollitore dopo aver circolato nell'edificio
- un campione di acqua dal rubinetto di svuotamento del bollitore
- un campione in un punto d'utenza il più lontano possibile dal bollitore

Se l'investigazione è legata all'evidenziazione di un caso di legionellosi, prelevare anche nelle installazioni che il malato ha utilizzato (docce, idromassaggi, ecc.)

1.2. Per i sistemi di trattamento dell'aria.- I prelievi mediante striscio o raccolta d'acqua di umidificazione sono effettuati preferibilmente nei punti seguenti: acqua di condensazione, acqua di scolo, vasca di umidificazione, sedimenti, sifoni, nicchie umide. La ricerca di *Legionella* spp. nell'aria è difficilmente realizzabile. Ciononostante, il fatto di constatare nell'aria emessa da un'installazione aerotecnica una proliferazione di batteri o muffe è un segnale di cattivo funzionamento e di allerta.

2. Tecniche di prelievo

I prelievi devono essere effettuati in modo che i risultati possano essere confrontati una volta con l'altra. Se si desidera controllare la contaminazione in condizioni normali d'utilizzo, si prenderà il primo getto d'acqua a temperatura d'utilizzo, eventualmente dopo stagnazione di una notte. Se si ricerca una contaminazione centrale, il prelievo sarà effettuato dopo scorrimento (qualche minuto fino a raggiungere una temperatura costante). Si può procedere a delle analisi quantitative (campioni di acqua) e/o a delle analisi qualitative (strisci). Sulla scheda di prelievo bisogna indicare l'ora, la data, il punto e le condizioni di prelievo, il tipo di acqua e la temperatura.

Prelievo di un litro d'acqua in una bottiglia sterile.- E' il metodo più adatto in quanto permette di standardizzare i risultati (analisi quantitativa, con risultato espresso in quantità di UFC/L). Un prelievo ridotto a 100 ml, più facile da trasportare, è meno interessante in quanto implica una perdita di sensibilità ed è meno rappresentativo.

Striscio per l'acqua sanitaria.- Dopo aver svitato la guarnizione del rubinetto o il soffione della doccia, gli strisci sono introdotti profondamente nell'apertura. Girare lo striscio 4 volte cercando di togliere del biofilm. Si può inseminare direttamente lo striscio su del terreno selettivo oppure metterlo in una provetta contenente 10 ml di acqua sterile o ancora in un terreno di trasporto umido (di diversi tipi). Questa procedura non è prevista dalla norma ISO 11731.

Striscio e acqua.- Lo striscio è prelevato come descritto in precedenza e viene tagliato sterilmente e introdotto nella stessa bottiglia usata per il prelievo d'acqua (effettuare prima lo striscio e poi il prelievo d'acqua).

Sedimenti, fanghi, ecc.- La quantità e la modalità di prelievo (liquido o striscio) dipenderanno dalla densità e dalla localizzazione.

3. Recipienti per i campioni

I campioni d'acqua (generalmente 1 litro) sono raccolti in bottiglie sterili di plastica o di vetro. Se sono già state usate in precedenza devono essere risciacquate con acqua distillata e sterilizzate. Per materiali come sedimenti, biofilm o depositi si raccomandano dei recipienti più piccoli con tappo a vite. I dettagli sull'origine e il volume del campione e l'eventuale presenza di biocidi devono essere annotati e trasmessi al laboratorio (informazioni utili per lo svolgimento dell'analisi).

4. Campionamento in presenza di biocidi

Se il campione d'acqua contiene dei biocidi (per esempio dei disinfettanti) e se si sospetta la presenza di biocidi ossidanti, bisogna aggiungere un agente inattivante in eccesso nel recipiente prima o durante il prelievo. Il cloro e gli altri ossidanti sono inattivati dall'aggiunta di tiosolfato di potassio o di sodio. Per l'inattivazione di altre sostanze chimiche informarsi presso il fornitore (non essi conoscono finora neutralizzanti universali).

5. Modalità di trasporto

Prima di spedire i campioni bisogna contattare il laboratorio per decidere il momento e le modalità più favorevoli. Se l'analisi è differita, i prelievi devono essere conservati al riparo dalla luce a una temperatura tra 4 e 8°C. Non congelare i campioni. La spedizione verso il laboratorio dev'essere effettuata di preferenza entro 24 ore a una temperatura tra 6°C e 18°C (il lasso di tempo massimo tra prelievo e messa in coltura dev'essere di 48 ore). Per l'invio di campioni d'acqua è preferibile usare bottiglie in plastica con tappo a vite (controllare che siano a chiusura stagna e utilizzare eventualmente del parafilm). Per l'invio di membrane di filtrazione, è importante utilizzare tubi abbastanza larghi da 20-50 ml (idealmente 2-3 cm di diametro) e a tenuta stagna.

Bibliografia

International Organization for Standardization. Water quality - Detection and enumeration of Legionella. ISO[11731]. 1998.