



Interpretazione dei risultati dal punto di vista  
igienico sanitario  
Luca Medini

LABCAM s.r.l.



Ci conosciamo?



# Chi siamo

1995

Azienda Speciale

Laboratorio Chimico Merceologico Camera di Commercio di  
SAVONA

Labcam srl

Laboratorio Chimico Merceologico  
Camera di Commercio RIVIERE DI LIGURIA - IMPERIA  
LA SPEZIA SAVONA

2015

# Chi siamo



Analisi di  
laboratorio  
(chimiche,  
microbiologiche  
e sensoriali)

Centro di  
Saggio BPL

Corsi di  
formazione

# **Presentazione**

## **Introduzione**

### **Il campionamento**

### **I metodi di analisi**

### **I risultati e il confronto con i valori di riferimento**

### **Conclusioni**

# INTRODUZIONE

# Introduzione

Quanto ce n'è?

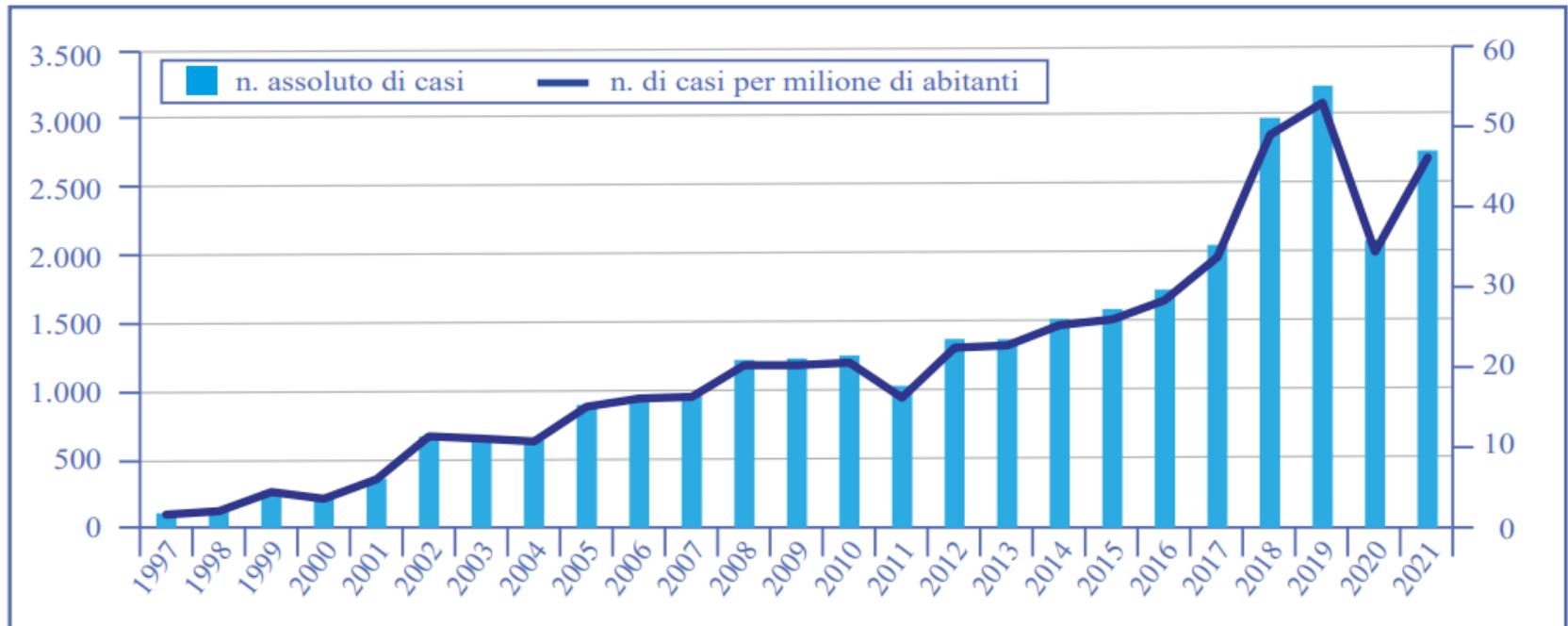


Figura 1 - Numero di casi e tasso di incidenza della legionellosi. Italia, 1997-2021

Istituto Superiore di Sanità: I risultati del sistema di sorveglianza della legionellosi nel 2021

# Introduzione

Quanto ce n'è?

**Tabella 1** - Numero di casi di legionellosi e tasso di incidenza per fascia d'età e sesso. Italia, 2021

| Classe di età | Maschi       |                    | Femmine    |                    | Totale       |                    |
|---------------|--------------|--------------------|------------|--------------------|--------------|--------------------|
|               | n. casi      | Tasso (n./milione) | n. casi    | Tasso (n./milione) | n. casi      | Tasso (n./milione) |
| 0-19          | 2            | 0,4                | 2          | 0,4                | 4            | 0,4                |
| 20-29         | 24           | 7,7                | 6          | 2,1                | 30           | 5,0                |
| 30-39         | 54           | 16,0               | 11         | 3,3                | 65           | 9,7                |
| 40-49         | 199          | 45,9               | 38         | 8,7                | 237          | 27,2               |
| 50-59         | 399          | 86,0               | 99         | 20,6               | 498          | 52,7               |
| 60-69         | 424          | 119,3              | 178        | 46,0               | 602          | 81,1               |
| 70-79         | 435          | 158,2              | 207        | 63,9               | 642          | 107,2              |
| 80+           | 358          | 211,8              | 290        | 104,0              | 648          | 144,7              |
| <b>Totale</b> | <b>1.895</b> | <b>65,6</b>        | <b>831</b> | <b>27,4</b>        | <b>2.726</b> | <b>46,0</b>        |

# Introduzione

Quanto ce n'è?

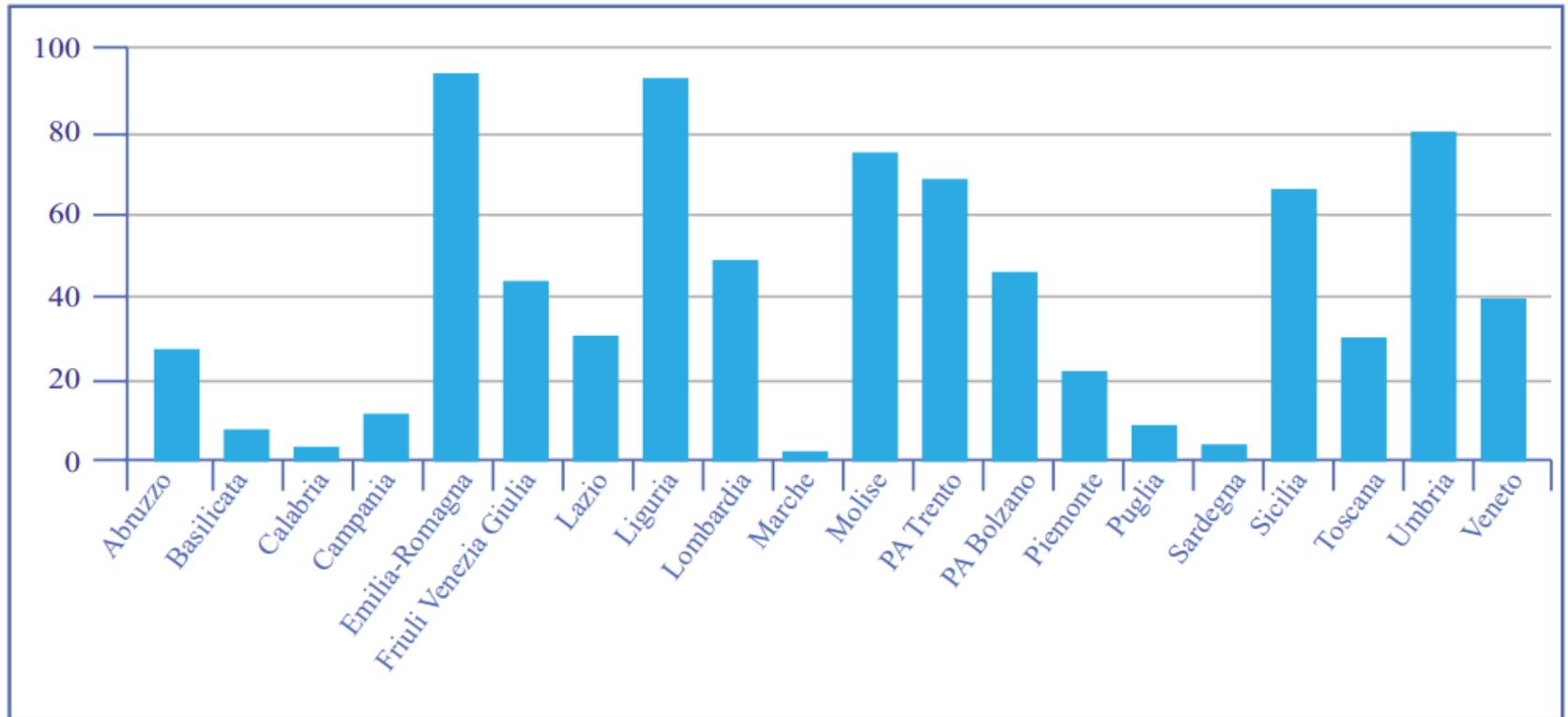


Figura 3 - Incidenza di legionellosi per Regione. Italia, 2021

# Introduzione

## Quanto ce n'è?

Positività dei campioni analizzati 40% positivi



Dei positivi

35% tra 10 e 100 MPN/l

24% tra 100 e 1.000 MPN/l

35% tra 1.000 e 10.000 MPN/l

6% tra oltre 10.000 MPN/l

# Il campionamento

# Il campionamento

Consentire la raccolta di porzioni rappresentative della matrice che si vuole sottoporre ad analisi.

Il campionamento costituisce quindi la prima fase di ogni processo analitico che porterà a risultati la cui qualità è strettamente correlata a quella del campione prelevato.

APAT CNR IRSA 1030

Definiamo inoltre l'incertezza di misura come il parametro non negativo che caratterizza la dispersione dei valori che sono attribuiti a un misurando, sulla base delle informazioni utilizzate.

Gli studi disponibili mettono in evidenza che l'incertezza associata al campionamento può contribuire anche per il 30-50% all'incertezza associata al risultato analitico finale ed è di gran lunga più elevata rispetto all'incertezza associata alla fase analitica (circa il 5%)

APAT CNR IRSA 1030

# Il campionamento

Deve esistere un piano di campionamento che deve prevedere ad esempio

- Misure di sicurezza per gli operatori addetti al prelievo
- Obiettivo dell'attività
- Materiale
- la descrizione del sito di campionamento;
- la strategia di campionamento;
- l'indicazione delle matrici da campionare;
- le metodiche di campionamento;
- la numerosità dei campioni;
- la durata del campionamento;
- la frequenza del campionamento;
- il numero di addetti e delle loro competenze necessarie per la conduzione del
- campionamento;
- la pianificazione logistica del campionamento (mezzi di trasporto, luoghi di accesso, ecc.);
- le modalità di trasporto dei campioni;
- la conservazione dei campioni;
- la pianificazione della sicurezza sul lavoro;
- la definizione del tipo di documentazione che deve essere utilizzato durante tutto



# Il campionamento

Applicando quanto previsto da documento «Linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi», considerata la pericolosità del batterio, le misure di sicurezza per gli operatori dovrebbero prevedere:

- Il 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.)
- Indossi quando necessario (ad es. in campionamenti in cui non è possibile lo spegnimento di torri di raffreddamento che determinano, nei confronti del campionatore, un'esposizione a rischio) dispositivi di protezione individuale
- Minimizzi la formazione di aerosol facendo scorrere l'acqua delicatamente dall'erogatore oggetto del campionamento
- Eviti l'esposizione ad aerosol

# Il campionamento

Dal punto di vista operativo bisogna considerare:

- Il rischio per sé e per gli altri di trasmissione del batterio dai siti potenzialmente contaminati.
- L'ecologia di Legionella.
- I fattori che ne favoriscono la sopravvivenza e la crescita.
- Gli elementi di base del campionamento microbiologico, in particolare il concetto di sterilità.
- Adottare appropriate precauzioni per eliminare cross-contaminazione tra i siti di campionamento



# Il campionamento

Prima di effettuare il campionamento, è necessario raccogliere (od aggiornare) le seguenti informazioni relative all'impianto idrico od aeraulico oggetto del monitoraggio:

- Schema della rete idrica (qualora esistente)
- Localizzazione della tubazione di alimentazione idrica alla rete
- Localizzazione degli eventuali serbatoi d'acqua calda e fredda e di tutti i sistemi che possano generare aerosol d'acqua
- Presenza di linee di distribuzione idrica contraddistinte da stagnazione/scarso ricambio idrico (ad es. camere non utilizzate per tempi superiori ai 7 giorni)
- Vetustà dell'impianto
- Distribuzione di ciascun impianto idrico a rischio
- Presenza di sistemi di disinfezione in continuo installati sull'impianto idro-sanitario, (tipo di impianto, caratteristiche del disinfettante, modalità di monitoraggio delle concentrazioni del disinfettante, ecc.)
- Distribuzione di ciascun impianto aeraulico a rischio
- Registro di manutenzione con tutti gli interventi ordinari e straordinari effettuati sugli impianti

# Il campionamento

## Materiale:

- Bottiglie sterili (preferibilmente di vetro, polietilene, polipropilene o altra plastica sterile)**
- 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)**
- Provette con 2-5 mL di acqua sterile**
- Disinfettante: etanolo al 70% v/v o propanolo al 70% v/v, ipoclorito di sodio al 10% (possibilmente in confezione spray)**
- Bisturi sterili**
- Termometro tarato, preferibilmente digitale con sensibilità 0,1 °C**
- Flambatore**
- Pennarelli resistenti all'acqua o etichette**
- Pinze sterili**
- Elastici**
- Forbici**
- Torcia elettrica**
- Macchina fotografica**
- Alcool isopropilico (propanolo) 70%, possibilmente spray.**

# Il campionamento

- acqua del circuito dell'acqua calda sanitaria e di quello dell'acqua fredda sanitaria soprattutto qualora la temperatura sia superiore a 20°C;
- 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, da raccogliere utilizzando dei tamponi;
- acqua d'umidificazione degli impianti aeraulici;
- acqua dell'impianto 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.

# I metodi di analisi

## I metodi di analisi

# Quali?

### Metodi colturali

- ISO 11731:2017  
Qualità dell'acqua – Conteggio di Legionella

### Metodi molecolari

- ISO/TS 12869:2019  
Qualità dell'acqua – Rilevamento e quantificazione di Legionella via Real-Time PCR dopo concentrazione

### Metodi MPN

- AFNOR IDX 33/06-06/19
- Metodo MPN

# I metodi di analisi

## ISO 11731:2017 Qualità dell'acqua – Conteggio di Legionella

La norma specifica i metodi di coltura e analisi per l'isolamento e il conteggio di Legionella in campioni d'acqua.

Questi metodi sono applicabili a qualunque tipo di acqua, comprese le acque potabili, naturali, industriali e di scarico. Possono essere utilizzati per matrici correlate all'acqua, quali biofilm, sedimenti, etc.

Non tutte le specie di Legionella risultano coltivabili, pertanto i metodi riportati nella norma ISO 11731 non sono in grado di rilevare tutte le specie di Legionella.

# I metodi di analisi

## ISO 11731:2017 Qualità dell'acqua – Conteggio di Legionella

Prevede più fasi:

- **Filtrazione**
- **Arricchimento**
- **Semina su terreno**
- **Letture delle colonie sospette  
(presunte)**
- **Conferma e identificazione  
delle colonie**
- **Risultato finale**



# I metodi di analisi

## ISO 11731:2017 Qualità dell'acqua – Conteggio di Legionella

### CONTEGGIO

- Esame delle piastre periodiche (ogni 24 ore) fino a 10 giorni massimo
- La colorazione delle colonie possono variare molto in funzione delle varie specie
- Può essere necessario effettuare delle diluizioni in caso di alta concentrazione di legionella o di contaminanti presenti



# I metodi di analisi

## ISO 11731:2017 Qualità dell'acqua – Conteggio di Legionella

### CONFERMA

Legionella cresce solo in terreni specifici con cisteina (subcampioni su terreni specifici): si utilizza il terreno BCYE supplementato con L-cisteina. Legionella non è in grado di crescere in assenza di L-cisteina e quindi la semina differenziale in terreno non supplementato risulta molto utile ad ulteriore conferma.

# I metodi di analisi

## ISO 11731:2017 Qualità dell'acqua – Conteggio di Legionella

### CONFERMA

#### Test di agglutinazione al lattice

Esistono 16 sierogruppi dei quali il SG1 risulta essere il più virulento. Si possono utilizzare più approcci: il metodo di immunoagglutinazione ed il metodo colony PCR (vedi ISO11731 Annex G)

# I metodi di analisi

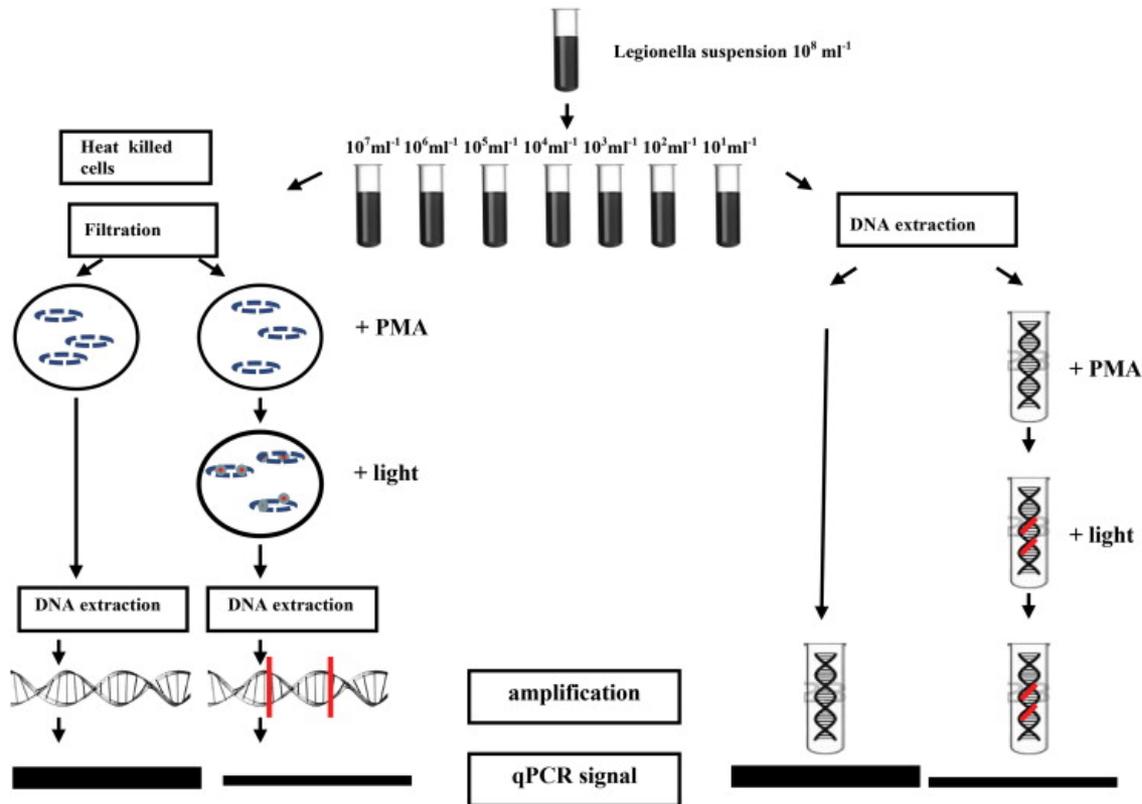
## Metodi molecolari (PCR)

### PRINCIPIO

I metodi colturali richiedono purtroppo più di 7 giorni per fornire risultati.

Una soluzione rapida è offerta dall'utilizzo della tecnica Real-Time PCR

(qPCR).



# I metodi di analisi

## Valutazione dei risultati con metodi molecolari (PCR)



Il negativo non necessita di  
ulteriore conferma colturale



Campione positivo deve  
essere confermato e  
conteggiato con il metodo  
colturale (no informazioni  
sulla vitalità dei batteri)

# I metodi di analisi

## Metodo MPN - AFNOR IDX 33/06-06/19

### PRINCIPIO

Equivalente al metodo ISO11731, consente di conteggiare in 7 giorni *Legionella pneumophila*.

Non è richiesta alcuna filtrazione ed in soli due minuti il campione è pronto per essere incubato. Al termine del periodo di incubazione basta conteggiare i pozzetti che si sono colorati nella Quanti-Tray per evidenziare la positività

Attraverso la verifica del campione contenuto nel pozzetto è possibile identificare con metodo latex o PCR l'eventuale presenza di *Legionella pneumophila* sierogruppo 1.

I risultati e il confronto con i valori  
di riferimento

# **I risultati e il confronto con i valori di riferimento**

## **Metodo MPN - AFNOR IDX 33/06-06/19**

**Il metodo di analisi AFNOR IDX 33/06 06/19 prevede l'utilizzo del test**

**Legiolert di IDEXX**

**Il metodo è stato validato in accordo alla norma ISO 13843:201, utilizzando campioni di acqua naturale e contaminata.**

**Il Legiolert è stato anche messo a confronto con il metodo colturale classico ISO 11731 2, dimostrandosi ugualmente specifico e selettivo.**

**Il Laboratorio ha accreditato il metodo in conformità alla norma ISO 17025**

# I risultati e il confronto con i valori di riferimento

## EQUIVALENZA TRA MPN e CFU

| Growth medium  |  | Reporting unit             |
|--|--|----------------------------|
| Solid (e.g., agar)                                   |   | CFU (colony forming units) |
| Liquid (e.g., Colilert®, multiple-tube fermentation) |  | MPN (most probable number) |

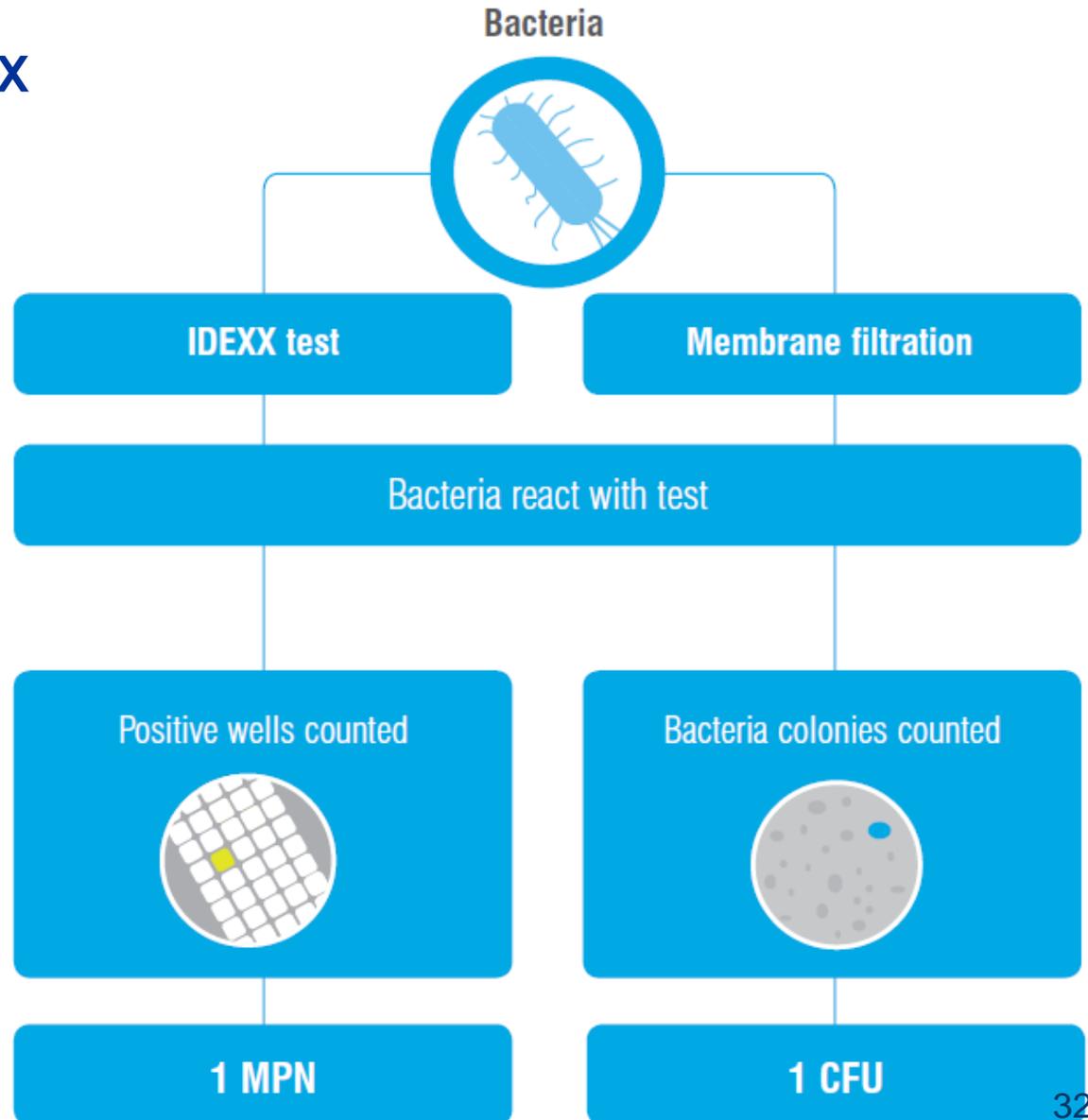
Both units are used to report the estimated number of bacteria in a sample.

# I risultati e il confronto con i valori di riferimento

Metodo MPN - AFNOR IDX  
33/06-06/19

EQUIVALENZA TRA

MPN e CFU



# I risultati e il confronto con i valori di riferimento

## Metodo MPN - AFNOR IDX 33/06-06/19

Il metodo fornisce risultati finali espressi in “Most probable number”, ossia MPN/litro.

Nel metodo ISO 11731:2017 si utilizzano terreni di coltura solidi, su cui crescono colonie batteriche, derivate dai microrganismi vitali presenti nel campione.

Nel metodo MPN AFNOR IDX 33/06-06/19 vengono rilevati i microrganismi vitali presenti in un terreno di coltura liquido, senza che si formino colonie vere e proprie, ma utilizzando un sistema a pozzetti multipli.

**Tabella 6. Tipi di intervento indicati per concentrazione di *Legionella* (UFC/L) negli impianti idrici a rischio legionellosi esercitati in tutti i siti.**

| Legionella (UFC/L) | Intervento richiesto   |
|--------------------|--|
| Sino a 100         | Verificare che le correnti pratiche di controllo del rischio siano correttamente applicate.  |
| Tra 101 e 1.000    | <p><b>In assenza di casi:</b><br/>Verificare che la struttura abbia effettuato una valutazione del rischio e che le misure di controllo elencate nelle presenti linee guida siano correttamente applicate.</p> <p><b>In presenza di casi:</b><br/>Verificare che siano in atto le misure di controllo elencate nelle presenti linee guida, sottoporre a revisione la specifica valutazione del rischio e effettuare una <b>disinfezione dell'impianto</b></p>  |
| Tra 1001 e 10.000  | <p><b>In assenza di casi:</b><br/>-Se meno del 20% dei campioni prelevati risulta positivo l'impianto idrico deve essere ricampionato, almeno dagli stessi erogatori risultati positivi, dopo aver verificato che le correnti pratiche di controllo del rischio siano correttamente applicate. Se il risultato viene confermato, si deve effettuare una revisione della valutazione del rischio, per identificare le necessarie ulteriori misure correttive. L'impianto idrico deve essere ricampionato, dopo l'applicazione delle misure correttive.</p> <p>-Se oltre il 20% dei campioni prelevati risultano positivi, è necessaria la <b>disinfezione dell'impianto</b> e deve essere effettuata una revisione della valutazione del rischio, per identificare le necessarie ulteriori misure correttive. L'impianto idrico deve essere ricampionato, almeno dagli stessi erogatori risultati positivi.</p> <p><b>In presenza di casi:</b><br/>A prescindere dal numero di campioni positivi, è necessario effettuare la <b>disinfezione dell'impianto</b> e una revisione della valutazione del rischio, per identificare le necessarie ulteriori misure correttive. L'impianto idrico deve essere ricampionato dopo la disinfezione, almeno dagli stessi erogatori risultati positivi</p> |
| Superiore a 10.000 | <p>Sia in presenza che in assenza di casi, l'impianto deve essere sottoposto a una <b>disinfezione (sostituendo i terminali positivi)</b> e a una revisione della valutazione del rischio.</p> <p>L'impianto idrico deve essere ricampionato, almeno dagli stessi erogatori risultati positivi.</p>  |

**Linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi**

# I risultati e il confronto con i valori di riferimento

Il metodo:

- Deve consentire di misurare quantità inferiori alla minore concentrazione di Legionella riportato in Tabella 6
- ogni misura è soggetta ad un'incertezza di misura (intervallo in cui è compreso il valore vero) di cui una «quota» è fornita dal campionamento
- Normalmente al risultato non viene associata l'incertezza di misura in quanto non significativa ai fini del confronto con i limiti di intervento indicati (ad esempio in Tabella 6)
- Quando non è possibile avere un campione d'acqua di un litro (es. campionamenti UTA, circuiti di riuniti odontoiatrici, ecc.) il risultato deve essere espresso indicando le UFC/volume campionato.

# Conclusioni

## Conclusioni

- a) **Il campionamento è fondamentale per la rappresentatività del campione e la qualità del risultato finale**
- b) **I metodi analitici si basano su principi differenti che possono comportare una diversa espressione del risultato**
- c) **L'innovazione tecnologica permette di ottenere risultati in tempi più brevi con uguale performance analitica**
- d) **Fondamentale è la garantire le stesse prestazioni analitiche per garantire la riferibilità delle misure**

Grazie per l'attenzione!

Luca Medini

Labcam srl

[luca.medini@labcam.it](mailto:luca.medini@labcam.it)