

Le verifiche di contaminazione da Legionella in contraddittorio

CRISTIAN RIBOLDI¹, LUCA CASLINI², ALESSANDRO MERLINO¹, GIANLUCA GAMBINO¹

¹ *Ce.S.N.I.R. srl, Villasanta (MB)*

² *M.P. Surl, Cucciago (CO)*

Introduzione

Com'è noto, gli impianti dell'acqua sanitaria (e non solo) sono sottoposti a controlli al fine di ridurre al minimo il rischio per l'uomo di contrarre la legionellosi durante l'esposizione ad aerosol. Tra le misure di controllo sono previste anche le analisi sul grado di contaminazione dell'acqua da parte della Legionella, batterio all'origine dell'eventuale infezione umana. È tuttavia molto difficile determinare quale sia la reale entità della contaminazione di un circuito idrico tramite delle analisi spot ed è pure difficile condurre delle buone verifiche in contraddittorio, ovvero da parte di due soggetti che le eseguono contestualmente.

Con questo lavoro si intende illustrare quali siano, a nostro avviso, i passaggi più critici in questi frangenti e proporre una possibile linea di condotta.

Materiali e Metodi

La vita del batterio (che in natura è presente nell'acqua) e la sua diffusione in un impianto idrico dipendono da diversi fattori che nel tempo possono essere facilitanti piuttosto che ostacolanti, anche a fasi alterne. Tali fattori comprendono le temperature dell'acqua circolante nell'impianto, la presenza di nutrimenti per il batterio, la frequenza di utilizzo dei diversi rami di cui l'impianto si compone, la presenza di accumuli idrici e il tempo di permanenza della stessa acqua nell'impianto o in parti di questo.

Per questi motivi la verifica dell'entità della carica batterica deve prevedere un'opportuna periodicità e una buona conoscenza dell'impianto per stabilire i punti di campionamento più rappresentativi e significativi (accumuli, ricircolo, erogatori, rami morti, fondi ciechi...).

Si deve anche essere preparati a trovare risultati molto distanti tra di loro nel corso del tempo. Non è infrequente riscontrare variazioni da poche migliaia di UFC/l (Unità Formanti Colonie/litro) a decine di migliaia di UFC/l tra due analisi eseguite su campioni prelevati ad alcune settimane di distanza tra uno e l'altro.

Quel che può però risultare sorprendente è che differenze significative possono sussistere anche tra le analisi di due campioni prelevati nel medesimo punto di misura in tempi ravvicinati, nello stesso giorno e addirittura nello stesso momento.

Risultati e discussione

Un campionamento multiplo non può essere costituito da una sequenza seriale di campionamenti, perché è facile che tra il primo e l'ultimo (anche nei casi in cui siano solo due) cambi il grado di concentrazione della Legionella nell'acqua. Pertanto un campionamento multiplo deve necessariamente prevedere un unico prelievo d'acqua da dividersi poi in campioni distinti.

Nel caso di campioni presi in contraddittorio, il metodo di campionamento risulta già un momento cruciale al quale prestare la massima attenzione al fine di evitare di inserire gradi di variabilità che potrebbero causare un discostamento dei risultati di concentrazione.

Fondamentale, oltre alla contemporaneità dell'acquisizione della stessa quota d'acqua, è anche l'accuratezza con cui sono effettuate le successive divisioni nei campioni da analizzare. Questi travasi devono essere eseguiti avendo l'accortezza di miscelare il campione prima di ogni atto di versamento in modo tale da mantenere una condizione di omogeneità.

Nonostante l'adozione di questi accorgimenti, non è tuttavia detto che la Legionella si distribuisca uniformemente tra i campioni. Ci possono essere situazioni di aggregazione tra cellule batteriche (situazione abbastanza comune tra molti batteri per la struttura stessa della parete cellulare), oppure di distacchi casuali di frazioni di biofilm, presente sulla superficie interna delle tubazioni, che possono "intrappolare" notevoli quantità di batteri. Se non è garantita la loro disaggregazione durante l'omogeneizzazione dei campioni si possono avere variabilità significative nei successivi conteggi.

L'analisi

Anche nella parte analitica diventa necessario adottare delle precauzioni per mantenere una confrontabilità tra i risultati di una verifica condotta in doppio. La norma di riferimento (UNI EN ISO 11731:2017) indica infatti differenti procedure per condurre l'analisi, lasciando scegliere all'analista la più adeguata. Tuttavia, l'adozione di criteri diversi per l'analisi di campioni da confrontare può rappresentare un'ulteriore causa di discrepanza tra i risultati.

La norma è strutturata in modo tale da porre l'analista microbiologico nella condizione di adottare una serie di decisioni orientate a definire la miglior procedura di analisi per ogni specifico campione. Tale percorso decisionale è riassunto in una matrice riportata all'allegato J della suddetta norma e prevede quattro step principali:

- il primo step coincide con la scelta della matrice;
- il secondo step prevede di decidere quale metodica adottare, in funzione della sensibilità desiderata. Le metodiche che offrono la possibilità di ottenere il limite di rilevabilità più basso sono la 2 (Membrane filter on plate) e la 3 (Filtration with washing procedure).
- Il terzo step prevede di selezionare il trattamento da applicare all'aliquota di campione, prima di essere piastrato sul terreno colturale, al fine di abbattere la carica batterica interferente;
- il quarto ed ultimo step prevede la selezione dei terreni colturali.

Tra gli step decisionali elencati, quelli che possono rappresentare una possibilità di discostamento dei risultati in caso di campioni multipli sono verosimilmente il secondo ed il terzo.

Tenuto conto dell'alto grado di variabilità del processo di analisi (ma anche di campionamento, come abbiamo visto) e con l'intento di ottenere dei risultati confrontabili per i campionamenti multipli, riteniamo opportuno attivare un coordinamento tra i laboratori ai quali si affidano le analisi, definendo una metodologia comune da adottare in questi specifici frangenti.

Conclusioni

Con questo lavoro abbiamo voluto focalizzare l'attenzione sui campionamenti di acqua per la ricerca della Legionella condotti in doppio, come nei casi in cui l'attività è svolta in contraddittorio.

Abbiamo evidenziato quali sono le variabili che possono compromettere la confrontabilità dei risultati e proposto dei possibili rimedi.

Per quanto possa apparire un'interferenza all'indipendenza dei laboratori incaricati, se non addirittura un'inaccettabile perdita delle garanzie del “doppio-cieco”, sulla base della nostra esperienza è necessario modulare i comportamenti come illustrato sopra, sia in fase di campionamento che di analisi.

BIBLIOGRAFIA

1. UNI EN ISO 11731:2017 “Qualità dell'acqua – Conteggio di Legionella”.
2. Conferenza Permanente per i rapporti tra Stato, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano (2015) “*Linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi*”, Approvato in Conferenza Stato-Regioni, nella seduta del 7 maggio 2015.