




**LABORATORIOS  
MICROAL**

• DESDE 1985 •


**PROTOCOLO DE TOMA Y TRANSPORTE DE  
MUESTRAS DE AGUAS PARA LA  
DETERMINACIÓN DE LEGIONELLA**

**(SEGÚN REQUISITOS DEL ANEXO VI  
DEL RD 487/2022)**

	<b>PROTOCOLO DE TOMA Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE AGUAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LEGIONELLA (SEGÚN REQUISITOS DEL ANEXO VI DEL RD 487/2022)</b>	Rev.:01
		10/11/2025
		Hoja 2 de 8

## ÍNDICE

1.	OBJETO	3
2.	ALCANCE	3
3.	DOCUMENTOS DE REFERENCIA	4
4.	GENERAL	4
5.	MATERIALES PARA LA TOMA DE MUESTRA	4
6.	PRÁCTICAS CORRECTAS DE HIGIENE EN LA TOMA DE MUESTRAS	5
7.	INACTIVACIÓN DE DESINFECTANTES	5
8.	TIPO DE ENVASES, VOLÚMENES, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS	6
9.	PROCEDIMIENTO DE TOMA DE MUESTRAS	6
10.	REGISTRO DE DATOS DE LA TOMA DE MUESTRA	8

	<b>PROTOCOLO DE TOMA Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE AGUAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LEGIONELLA (SEGÚN REQUISITOS DEL ANEXO VI DEL RD 487/2022)</b>	Rev.:01
		10/11/2025
		Hoja 3 de 8

## 1. OBJETO

El Real Decreto 487/2022, de 21 de junio, por el que se establecen los requisitos sanitarios para la prevención y el control de la legionelosis, establece que la toma de muestras se llevará a cabo según procedimientos documentados que figurarán en el programa de muestreo y análisis del agua.


El objeto de este procedimiento es establecer los pasos a seguir para realizar la toma de muestras de agua para la determinación de Legionella mediante cultivo, así como para ensayos microbiológicos y fisicoquímicos, según los criterios establecidos en el anexo VI del RD 487/2022, de forma que se garantice la calidad del proceso y la fiabilidad de las muestras que posteriormente serán analizadas en el laboratorio.

## 2. ALCANCE

Este procedimiento es de aplicación cuando se requiera la realización de la toma de muestra de aguas en instalaciones con riesgo de proliferación y diseminación de legionella.

Las instalaciones incluidas en este procedimiento son las descritas en el anexo I del RD487/2022 (relación no exhaustiva de instalaciones y equipos):

1. Sistemas de agua sanitaria.
2. Torres de refrigeración y condensadores evaporativos.
3. Equipos de enfriamiento evaporativo.
4. Centrales humidificadoras industriales.
5. Humidificadores.
6. Sistemas de agua contra incendios.
7. Sistemas de agua climatizada o con temperaturas similares a las climatizadas ( $\geq 24$  °C) y aerosolización con/sin agitación y con/sin recirculación a través de chorros de alta velocidad o la inyección de aire, vasos de piscinas polivalente con este tipo de instalaciones, vasos de piscinas con dispositivos de juego, zonas de juegos de agua, setas, cortinas, cascadas, entre otras.
8. Fuentes ornamentales con difusión de aerosoles y fuentes transitables.
9. Sistemas de riego por aspersión en el medio urbano o en campos de golf o deportes.
10. Dispositivos de enfriamiento evaporativo por pulverización mediante elementos de refrigeración por aerosolización.
11. Sistemas de lavado de vehículos.
12. Máquinas de riego o baldeo de vías públicas y vehículos de limpieza viaria.
13. Cualquier elemento destinado a refrigeración y/o humectación susceptible de producir aerosoles no incluido en el resto de puntos.
14. Instalaciones de uso sanitario / terapéutico: Equipos de terapia respiratoria; respiradores; nebulizadores; sistemas de agua a presión en tratamientos dentales; bañeras terapéuticas con agua a presión; bañeras obstétricas para partos e instalaciones que utilicen aguas declaradas mineromedicinales o termales.
15. Cualquier otra instalación que utilice agua en su funcionamiento y produzca o sea susceptible de producir aerosoles que puedan suponer un riesgo para la salud de la población.

	<b>PROTOCOLO DE TOMA Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE AGUAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LEGIONELLA (SEGÚN REQUISITOS DEL ANEXO VI DEL RD 487/2022)</b>	Rev.:01
		10/11/2025
		Hoja 4 de 8

### 3. DOCUMENTOS DE REFERENCIA

Como referencias básicas para la elaboración de este procedimiento se han tomado los criterios establecidos en los siguientes documentos (todos ellos en revisión actualizada):

- Real Decreto 487/2022, de 21 de junio, por el que se establecen los requisitos sanitarios para la prevención y el control de la legionelosis.
- Real Decreto 614/2024, de 2 de julio, por el que se modifica el Real Decreto 487/2022, de 21 de junio, por el que se establecen los requisitos sanitarios para la prevención y el control de la legionelosis.
- UNE-EN ISO 19458 Calidad del agua. Muestreo para el análisis microbiológico.

### 4. GENERAL

El objetivo de la toma de muestra es recoger un volumen de agua suficiente como para ser fácilmente transportada al laboratorio de análisis para su investigación. La muestra debe ser homogénea y representativa de las características medias del total del volumen de agua de la instalación.

En el transcurso del transporte de la muestra desde el lugar de toma hasta el laboratorio donde se practicarán los análisis, puede ocurrir que las características microbiológicas y físico-químicas de la muestra varíen. Esto debe evitarse en lo posible reduciendo al mínimo el tiempo transcurrido entre toma de muestra y la determinación, y/o empleando algún medio efectivo de preservación que no altere de forma perceptible su calidad.


Para cada una de las muestras tomadas, la información recogida sobre la misma permitirá en todo momento garantizar su correlación con la planificación especificada en el programa de muestreo, así como con las condiciones de transporte, el documento de toma de muestras, el de emisión de resultado del laboratorio.

El conocimiento de la instalación y de las actividades previas en materia de mantenimiento, limpieza y desinfección llevadas a cabo en ella, son factores determinantes en los resultados analíticos y estos a su vez lo son en la verificación de la eficacia de los procedimientos de mantenimiento, limpieza y desinfección, por tanto, se hace necesario ofrecer las mayores garantías en el procedimiento de toma de muestra.

### 5. MATERIALES PARA LA TOMA DE MUESTRA

Para realizar la toma de muestra se necesitarán los siguientes materiales:

- Termómetro.
- Clorímetro.
- Medidor de biocida in situ, con el kit establecido en la autorización.
- Neutralizante específico del biocida, según autorización (la instalación deberá disponer del neutralizante específico en relación con el desinfectante utilizado en la desinfección).
- Envases comerciales con neutralizante (si procede, p.ej. con tiosulfato sódico).
- Nevera portátil con posibilidad de refrigeración.
- Herramientas para la manipulación en determinados puntos del muestreo (destornilladores, llaves de Allen, llave inglesa, alicates, etc.).
- Guantes desechables.
- Alcohol o toallitas desinfectantes.

	<b>PROTOCOLO DE TOMA Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE AGUAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LEGIONELLA (SEGÚN REQUISITOS DEL ANEXO VI DEL RD 487/2022)</b>	Rev.:01
		10/11/2025
		Hoja 5 de 8

- Mechero o soplete portátil para flameado si procede.
- Rotuladores, bolígrafos y etiquetas resistentes al agua.
- Embalajes adecuados que eviten ruptura y derrame en el transporte.
- Registro de toma de muestra.
- En caso preciso, para su consulta, el programa de muestreo y el procedimiento de toma de muestras.

Los equipos de lectura-medición empleados (termómetro, pH metro, turbidímetro, etc.), deben encontrarse dentro del periodo de calibración.

## 6. PRÁCTICAS CORRECTAS DE HIGIENE EN LA TOMA DE MUESTRAS

Se tendrán en consideración las siguientes precauciones para minimizar la contaminación durante la toma de muestra, en particular en la toma de muestra para análisis microbiológicos:

- Lavarse las manos o llevar guantes desechables.
- No fumar, comer o beber mientras se toman muestras.
- Si procede, limpiar el punto de toma de muestras. En el caso de toma de muestras para ensayos microbiológicos, además de limpiar el punto de toma de muestra siempre se debe desinfectar (por ejemplo, con un algodón impregnado con alcohol, toallita desinfectante, flamear, etc.) con carácter inmediato a la toma de muestra.
- No introducir ningún objeto o instrumento (termómetro, pH-metro, ...) dentro del recipiente que contiene la muestra para la realización de análisis microbiológico. Los posibles análisis in situ deben realizarse en una sub-muestra en un recipiente aparte.
- Las neveras, o refrigeradores, en la que se transporten las muestras se deben mantener limpias. Las utilizadas para las muestras de análisis microbiológicos deben ser de uso exclusivo para este tipo de muestras.


## 7. INACTIVACIÓN DE DESINFECTANTES

La calidad microbiológica de un agua desinfectada con un biocida oxidante (por ejemplo, cloro, cloramina, bromo u ozono), se debe determinar interrumpiendo la acción del oxidante tan pronto como se tome la muestra. Para ello se añade un agente reductor, como el tiosulfato de sodio, a los recipientes de muestra:

- 0,1 ml de tiosulfato sódico pentahidratado ( $\rho(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 18 \text{ mg/ml}$ ), por cada 100 ml de capacidad del recipiente, inactiva de 2 a 5 mg/l de cloro.

Es decir, 1 ml de tiosulfato sódico pentahidratado ( $\rho(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 18 \text{ mg/ml}$ ) neutraliza 1000 ml de muestra con una concentración de 2 a 5 mg/l de cloro.

Los desinfectantes que pueda contener la muestra deben ser neutralizados con los neutralizantes recogidos en la resolución de autorización del biocida. En estos casos, se solicitará a la instalación la información (ficha técnica, registro sanitario, etc) sobre las dosificaciones del neutralizante específico del biocida con el fin de asegurar que la neutralización se realiza de forma correcta. Si por cualquier causa no fuese posible garantizar la correcta neutralización de la muestra se dejará registro en el formato de toma de muestra y se informará al laboratorio en la recepción de la muestra.

	<b>PROTOCOLO DE TOMA Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE AGUAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LEGIONELLA (SEGÚN REQUISITOS DEL ANEXO VI DEL RD 487/2022)</b>	Rev.:01
		10/11/2025
		Hoja 6 de 8

## 8. TIPO DE ENVASES, VOLÚMENES, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

En general en las muestras tomadas:

- Se debe evitar la exposición a la luz y calor.
- No mezclar muestras de agua fría y caliente en la misma nevera.

- Para parámetros microbiológicos:

Usar envases estériles de polietileno o similar, con cierre hermético.

Dejar un espacio de cabeza para poder homogeneizar la muestra.

El tiempo transcurrido entre la toma de la muestra y el análisis, y la temperatura de conservación entre ambos, deberían ajustarse a los requisitos especificados en la siguiente tabla:

Ensayo	Tiempo (horas)	Temperatura (°C) <sup>(1)</sup>	Volumen
Aerobios totales	<24	5 ± 3	50-100
Legionella spp.	<24	6-18	1.000
	>24 y <48	5 ± 3	

(1) La temperatura de refrigeración se refiere al entorno de la muestra, no a la muestra en sí.

- Para parámetros Fisicoquímicos:

Llenar los envases completamente y cerrarlos sin dejar cámara de aire.

Los envases y volúmenes se especifican en la siguiente tabla.

Parámetro	Recipiente	Volumen (ml) (*)	Parámetro	Recipiente	Volumen (ml) (*)
pH	P/V	100	Cloruros	P/V	100
Conductividad	P/VB	100	Alcalinidad	P/V	100
Turbidez	P/V	100	Sales de ácidos fuertes	P/V	100
Hierro total	P/VB	100	Sulfatos	P/V	100
Calcio, dureza	P/V	100	Sólidos en suspensión	P/V	500

(\*) Solicitar al laboratorio información del volumen necesario para la determinación de los parámetros a determinar.

P: Polimérico; V: Vidrio; VB: Vidrio borosilicatado

Las muestras para determinación de legionella se acondicionarán para el transporte de la siguiente forma:

- Recipiente o envase primario con las siguientes características: Rígido, con buena resistencia al impacto y provistos de cierre hermético (con junta de seguridad).
- Nevera rígida para el transporte de los recipientes o envases primarios.
- Transporte de las neveras en vehículo comercial de uso exclusivo por personal de laboratorio.

## 9. PROCEDIMIENTO DE TOMA DE MUESTRAS


En el proceso de toma y transporte de muestras no se mezclarán en un mismo envase muestras procedentes de diferentes instalaciones o de distintos puntos de muestreo ni de temperaturas muy diferentes.

El orden de toma de muestra será el siguiente:

1. Envase para parámetros microbiológicos: en un solo envase (con neutralizante) con capacidad suficiente para los ensayos a realizar y garantizar la cámara de aire o, en su caso, tantos envases como ensayos a realizar.
2. Envase para para ensayos F-Q. (sin neutralizante).

Proceso de toma de muestra en función del tipo de instalación:

Sistemas de agua sanitaria	Acumuladores ACS	<p>1º. Tomar preferiblemente en la parte baja del acumulador</p> <p>2º. Si el punto de llenado con agua fría está en la parte inferior, cerrar la llave de entrada (comunicar esta acción al responsable de las instalaciones, si no es posible cerrar la llave y se procede a tomar la muestra, debe quedar registrado en el formato de toma de muestra esta circunstancia).</p> <p>3º. Si existiera una manguera o conducción hasta el desagüe:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Retirar la manguera o conducción</li> <li>- O dejar correr el agua para eliminar este primer vertido contenido en ella.</li> </ul> <p>4º. Recoger el volumen necesario de agua.</p> <p>5º. Medir la Temperatura y registrarla.</p> <p>6º. Registrar los datos in situ de los parámetros, según lo establecido en el programa de muestreo.</p>
	Depósitos AFCH	<p>Para detección de Legionella spp., recoger en uno de los siguientes puntos:</p> <p>1º. Parte baja del depósito a través de la purga ya que así se pueden recoger también muestra con posibles restos de material sedimentado:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Si existiera una manguera o conducción hasta el desagüe: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Retirar la manguera o conducción,</li> <li>- O dejar correr el agua para eliminar el primer vertido contenido en ella.</li> </ul> </li> <li>Recoger el volumen necesario de agua.</li> </ol> <p>2º. Interior del depósito (si es accesible): Tomar la muestra en un punto lo más alejado posible del aporte de agua, así como de la inyección de desinfectante si existe, o del posible sistema de recirculación del agua del depósito.</p> <p>3º. Grifo de toma de muestras a la salida del depósito.</p>
	Puntos terminales (grifos y duchas)	<p>Colocar el grifo (si es monomando o termostático) en posición máxima de agua caliente o fría según el sistema que se va a muestrear:</p> <p><b>1. Muestra sin purga:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Abrir el grifo y recoger el volumen de muestra necesario para los ensayos microbiológicos.</li> <li>Medir Tª del agua y otros parámetros in situ según que procedan.</li> <li>Tomar muestra para el resto de los parámetros F-Q a analizar en laboratorio.</li> </ol> <p>Muestras en duchas murales: Sin perder agua de la muestra sin purga y sin dispersar aerosol, se puede embocar un envase de recogida con boca ancha para que no haya derrames o rodear la ducha con una bolsa estéril sin fondo para facilitar el llenado del envase.</p> <p><b>2. Muestra con purga:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Dejar correr el agua hasta estabilización, al menos 2 minutos para AFCH, tomar el volumen de muestra necesario para los ensayos microbiológicos.</li> <li>Medir Tª del agua y, otros parámetros in situ que procedan.</li> <li>Tomar muestra para el resto de los parámetros F-Q a analizar en laboratorio.</li> </ol>
	Circuito de retorno de ACS	<p>En circuitos de retorno de ACS con dispositivo toma-muestras se tomarán como en un terminal con purga, dejando correr el agua, para estabilización, al menos durante 1 minuto.</p>
Torres de refrigeración y condensadores evaporativos		<p>1. Tomar el volumen de muestra necesaria para los ensayos microbiológicos.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Toma de muestra en la tubería de retorno del circuito: Para cuantificar se deja correr el agua justo para vaciar la tubería y, para detección no se dejará correr.</li> <li>- Toma de muestra en dispositivo toma-muestra: Dejar correr el agua para eliminar el primer vertido de agua.</li> </ul> <p>2. Medir Tª y otros parámetros in situ que procedan.</p> <p>3. Tomar muestra para el resto de los parámetros F-Q.</p>
Sistemas de agua climatizada o con Tª similares a las climatizadas (≥24 °C) y aerosolización con/sin agitación y con/sin recirculación a través de chorros de alta velocidad o la inyección de aire, vasos de piscinas polivalente con este tipo de instalaciones, vasos de piscinas con dispositivos de juego, zonas de juegos de agua, setas, cortinas, cascadas, entre otras.		<p>1. Tomar la muestra del agua del vaso, procediendo previamente a la apertura de los difusores de agua y soplantes de aire durante al menos 1 minuto y sumergiendo el envase a una profundidad de unos 30 cm en el agua en posición prácticamente horizontal, pero con la boca del envase apuntando hacia arriba de manera que no se disperse el neutralizante del envase.</p> <p>2. Toma de muestra en el retorno, punto más alejado o en la zona de recirculación.</p> <p>3. Si se toma una muestra de uno de los difusores, seguir el procedimiento de puntos terminales.</p> <p>4. Medir Tª y los parámetros a determinar in situ que procedan.</p> <p>5. Recoger muestra para el resto de parámetros FQ a analizar en laboratorio</p>
Otras instalaciones		<p>Para el resto de instalaciones se deben utilizar como referencia los procedimientos establecidos en las partes anteriores de acuerdo a la similitud técnica de la instalación a muestrear</p>

	<b>PROTOCOLO DE TOMA Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE AGUAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LEGIONELLA (SEGÚN REQUISITOS DEL ANEXO VI DEL RD 487/2022)</b>	Rev.:01
		10/11/2025
		Hoja 8 de 8

## 10. REGISTRO DE DATOS DE LA TOMA DE MUESTRA

Identificar el envase o etiqueta del envase de la muestra de forma inequívoca.

Los datos de identificación del envase de la muestra coincidirán con los indicados en su Registro de Toma de Muestras.

Contenido mínimo del registro de toma de muestra	
Datos que deben acompañar a la muestra para su análisis (información a suministrar al laboratorio de análisis)	Otros datos a registrar de la toma de muestra
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Día y hora de toma de la muestra.</li> <li>-Identificación de la muestra: Código de identificación</li> <li>-Naturaleza de la muestra (agua, biocapa).</li> <li>-Neutralizante utilizado en la toma de muestra o, en su caso, indicación expresa de no utilización de neutralizante (solo para ensayos microbiológicos).</li> <li>-Volumen de muestra tomada.</li> <li>-Investigaciones a efectuar (parámetros a determinar)</li> <li>-Identificación del remitente de la muestra (puede o no coincidir con el tomador de la muestra, establecimiento de procedencia, ...).</li> <li>-Identificación del transportista y medio de transporte.</li> <li>-Fecha de entrega de la muestra al transportista (día y hora).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Identificación de la persona que realiza la muestra.</li> <li>-Identificación del establecimiento de procedencia.</li> <li>-Tipo de Instalación de la que procede la muestra (torre de refrigeración, agua caliente sanitaria, etc.).</li> <li>-Identificación del punto de muestreo.</li> <li>-Motivo del muestreo.</li> <li>-Resultados de los parámetros físico-químicos determinados in situ que procedan (<math>T^a</math>, Biocida, etc).</li> <li>-Resultados obtenidos de los ensayos efectuados sobre muestras tomadas simultáneamente o, en su defecto, correlación inequívoca con el informe del ensayo correspondiente.</li> </ul>



En cumplimiento de los requisitos establecidos en el *Real Decreto 487/2022, de 21 de junio, por el que se establecen los requisitos sanitarios para la prevención y el control de la legionelosis*, en su Anexo VII - Métodos de análisis, **LABORATORIOS MICROAL, S.L.** certifica que los siguientes parámetros se realizan bajo los métodos indicados a continuación los cuales se encuentran validados conforme a las siguientes normas de referencia:

ENSAYO	METODO / NORMA DE REFERENCIA	VALIDACIÓN		
		Límite de detección	Límite de cuantificación	Incertidumbre
Rto. de microorganismos aerobios a 22 °C	CULTIVO EN PLACA / UNE-EN ISO 6222	-	0 ufc/ml	-
Conductividad	ELECTROMETRÍA / basado en SM 2510 B Ed.24	2 µS/cm	10 µS/cm	15%
Turbidez	NEFELOMETRÍA / basado en UNE-EN ISO 7027	0.1 U.N.F.	0.3 U.N.F.	30 %
Hierro	ICP / UNE-EN ISO 17294-2	0.005 mg/l	0.02 mg/l	25 %

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado:



Fdo.: D. Mariano Barroso González.  
Director Gerente