



Laboratorio Nazionale di Riferimento per le legionelle
Dipartimento di Malattie Infettive Parassitarie ed Immuno-mediate
Istituto Superiore di Sanità



DETERMINAZIONE DI LEGIONELLA

Procedura integrativa al metodo ISO 11731: 1998 "Water quality — Detection and enumeration of *Legionella*" in base alle *Linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi* (79/CSR 7 maggio 2015).

INDICE

Premessa	3
1. Scopo	3
2. Riferimenti	3
3. Termini e Definizioni	3
4. Misure di sicurezza	3
5. Principio	4
6. Terreni di coltura e reagenti	4
7. Apparecchiature	6
8. Campionamento	6
8.1 Contenitori.....	6
8.2 Campionamento in presenza di prodotto biocida.....	6
8.3 Trasporto e conservazione.....	6
9. Procedura	7
9.1 Campioni.....	7
9.1.1 <i>Generale</i>	7
9.1.2 <i>Filtrazione</i>	7
9.1.3 <i>Procedura per campioni ambientali a matrice acquosa - centrifugazione</i>	8
9.1.4 <i>Metodi per campioni ambientali a matrice non acquosa</i>	9
9.1.4.1 <i>Metodo C1 per depositi o sedimenti</i>	9
9.1.4.2 <i>Metodo C2 per incrostazioni</i>	9
9.1.4.3 <i>Metodo C3 per biofilm</i>	9
9.1.4.4 <i>Metodo C4 per filtri</i>	9
9.2 Semina, incubazione ed esame delle piastre.....	10
9.3 Conferma e identificazione e delle colonie presunte di <i>Legionella</i>	11
9.3.1 Prova differenziale preliminare	
9.3.2 Identificazione definitiva	
10. Espressione dei risultati	13
10.1 Matrice acquosa.....	13
10.2 Matrice non acquosa.....	15
11. Rapporto di prova	15

Premessa

Il presente documento viene emesso a supporto del metodo ISO 11731:1998 per permettere ai laboratori di eseguire la ricerca e la quantificazione della *Legionella* secondo le indicazioni riportate nel documento *Linee Guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi* (79/CSR del 7/5/2015).

Quanto definito nel presente documento non costituisce una modifica sostanziale al metodo ISO 11731, anche in merito all'eventuale utilizzo del supplemento selettivo *MWY* al posto del *GVPC* previsto da ISO 11731. I dati di validazione riportati dalla letteratura scientifica internazionale dimostrano infatti l'equivalenza dei due supplementi.

Il laboratorio, nella dichiarazione del metodo utilizzato nel rapporto di prova, oltre al riferimento ISO 11731:1998 può riportare, quando applicabile, anche un riferimento al presente documento.

1. Scopo

Vedi norma ISO 11731:1998, con le seguenti precisazioni: nel presente documento sono riportate le procedure per la ricerca, identificazione e quantificazione di *Legionella* in campioni d'acqua (9.1.2 e 9.1.3) e per la ricerca qualitativa in altre matrici quali depositi o sedimenti, incrostazioni, biofilm e filtri (9.1.4).

2. Riferimenti

ISO 11731:1998

Linee Guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi (79/CSR del 7/5/2015)

ISO 11731-2: 2004

3. Termini e Definizioni

Vedi norma ISO 11731:1998

4. Misure di sicurezza

Vedi norma ISO 11731:1998.

Ad integrazione, si riportano dalla Linea Guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi (79/CSR del 7/5/2015) allegato 4, "Misure di sicurezza" le seguenti istruzioni:

Legionella è un microrganismo appartenente al gruppo 2 di rischio come indicato nel Titolo X del D. Lgs n. 81/2008 e s.m.i. Considerando che la modalità di trasmissione dell'infezione è attraverso inalazione di aerosol si deve valutare attentamente qualsiasi fase della prova che generi aerosol. I campioni in cui *Legionella* può essere presente, devono essere maneggiati da personale esperto operando con appropriati dispositivi di protezione individuale (maschere, guanti, occhiali; vedi caratteristiche nel paragrafo DPI del capitolo 6. *“Rischio legionellosi associato ad attività professionale”*) e in laboratori adeguatamente attrezzati e dotati di cappe *Biohazard di classe II* con certificazione di conformità alla norma tecnica EN 12469 (D.Lgs 81/2008 e s.m.i., *Linee guida recanti indicazioni ai laboratori con attività di diagnosi microbiologica e controllo ambientale della legionellosi - G.U. N. 29 del 5 febbraio 2005*).

In aggiunta alla protezione individuale, l'operatore, durante l'esecuzione della prova, deve prestare la massima attenzione a mantenere le condizioni di sterilità del campione eliminando qualsiasi possibilità di cross-contaminazione con eventuali altri campioni attraverso ad esempio imbuti e/o porta filtro della rampa o altro sistema filtrante utilizzato, pinzette etc.

5. Principio

La presente procedura consente di determinare la concentrazione di *Legionella* mediante filtrazione su membrana o attraverso centrifugazione. I campioni dopo filtrazione o centrifugazione, sono sottoposti a semina in terreni di coltura selettivi, incubazione, conferma delle colonie presunte e quantificazione.

Tali indicazioni sono il frutto dell'esperienza maturata dal Laboratorio Nazionale di Riferimento per le legionelle, dai Laboratori Regionali di Riferimento e da altri laboratori di rilevanza scientifica nell'applicazione delle Linea Guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi (79/CSR del 7/5/2015) e della ISO11731:1998 *“Water quality-detection and enumeration of Legionella”*.

6. Terreni di coltura e reagenti

Vedi norma ISO 11731:1998, punto 6.

In alternativa al supplemento selettivo riportato nella succitata norma, si può utilizzare il supplemento selettivo di Wadowsky e Yee (MWY) contenente glicina, vancomicina, polimixina B, anisomicina, blu di bromotimolo, porpora bromo cresolo composto come di seguito descritto su un volume di 100 mL:

Glicina	300mg
---------	-------

Polimixina B solfato	5000 U.I.
Anisomicina	8,0 mg
Vancomicina	0,1mg
Blu di bromo timolo	1,0 mg
Porpora di bromo cresolo	1,0 mg

La letteratura scientifica internazionale ha dimostrato la sostanziale equivalenza tra GVPC e MWY.

Inoltre, in aggiunta ad un terreno selettivo, si può prendere in considerazione l'uso di BCYE, già previsto dalla ISO 11731-2: 2004 per la determinazione di *Legionella* in campioni con bassa concentrazione batterica. L'uso del BCYE, si è rivelato molto utile per avere un maggior recupero di legionelle e un migliore isolamento di *Legionella non-pneumophila*.

Modalità di preparazione MWY

- Preparare il supplemento a base di polimixina B solfato aggiungendo un appropriata quantità di polimixina B solfato in 100 mL d'acqua per raggiungere una concentrazione pari a 10.000 UI/mL. Mescolare e decontaminare mediante filtrazione per membrana. Dispensare in aliquote da 5 mL in contenitori sterili e conservare a -20 ± 3 °C. Scongellare a temperatura ambiente prima dell'uso.
- Preparare il supplemento a base di anisomicina aggiungendo 2 g di anisomicina in 100 mL di etanolo e decontaminare mediante filtrazione per membrana. Prelevare aliquote di 4 mL e trasferire in contenitori sterili.
- Preparare una soluzione a base di Blu di bromotimolo aggiungendo 10 mg di blu di bromotimolo a 10 mL d'acqua, mescolare e decontaminare mediante filtrazione per membrana.
- Preparare una soluzione a base di porpora di bromo cresolo aggiungendo 10 mg di porpora di bromo cresolo a 10 mL d'acqua, mescolare e decontaminare mediante filtrazione per membrana.
- I supplementi a base di antibiotici (ad eccezione della anisomicina) possono essere conservati fino a 6 mesi quando sono congelati. Un volume di ciascun supplemento selettivo e ciascuna soluzione sopra descritti, devono essere aggiunti al BCYE, dopo aver aggiunto α -ketoglutarato e 3 g di glicina priva di ammonio e aver aggiustato il pH a $6,8 \pm 0,2$. I volumi di supplementi e di soluzioni sopradescritti devono essere tali da

ottenere un supplemento selettivo di Wadowsky e Yee (MWY) con la composizione descritta al punto 6.

Per il controllo di qualità dei terreni valutare la crescita sia di *Legionella pneumophila* che *Legionella bozemanii*.

In alternativa si possono utilizzare terreni e reagenti deidratati seguendo per la preparazione le indicazioni fornite dalle case produttrici.

Si può inoltre prendere in considerazione la possibilità di utilizzare tutti i terreni sopra citati già pronti in piastra sottoponendoli a controllo di qualità, qualora non fosse stato effettuato dalla ditta produttrice. In questo caso verificare sempre la data di scadenza e seguire le istruzioni per la conservazione e l'utilizzo indicate dal produttore.

7. Apparecchiature

Vedi norma ISO 11731:1998

8. Campionamento

8.1 Contenitori

Vedi norma ISO 11731:1998 e Allegato 3 delle Linee Guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi (79/CSR del 7/5/2015).

8.2 Campionamento in presenza di prodotto biocida

Vedi norma ISO 11731:1998 e Allegato 3 delle Linee Guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi (79/CSR del 7/5/2015).

8.3 Trasporto e conservazione

I campioni prelevati devono essere consegnati al laboratorio nel minor tempo possibile affinché l'analisi possa essere iniziata preferibilmente entro le 24 ore dal campionamento e trasportati a temperatura ambiente, al riparo dalla luce, avendo cura di separare i campioni di acqua calda da quelli di acqua fredda.

Qualora non sia possibile consegnare i campioni come sopra riportato, questi devono essere conservati necessariamente $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e trasportati in un contenitore in grado di

mantenere tale temperatura e consegnati in tempo utile affinché l'analisi venga iniziata il più presto possibile e comunque non oltre 4 giorni dal prelievo.

9. Procedura

9.1 Campioni

9.1.1 Generale

Vedi norma ISO 11731:1998 con le precisazioni di seguito indicate in base all'Allegato 4 della Linee Guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi (79/CSR del 7/5/2015), "Procedimento per campioni ambientali a matrice acquosa".

La procedura descritta ai punti 9.1 – 9.3 del presente documento deve essere eseguita anche su un campione bianco della stessa acqua distillata sterile utilizzata per l'analisi come da procedura per verificare eventuali falsi positivi.

9.1.2 Procedura per campioni ambientali a matrice acquosa - Filtrazione

- 9.1.2.1 Agitare bene il campione d'acqua manualmente per staccare le legionelle che aderiscono alle pareti del contenitore, soprattutto se è di plastica (questo avviene in particolare durante il trasporto e la conservazione).
- 9.1.2.2 Se ci si attende una concentrazione maggiore o uguale a 10^5 si può seminare direttamente il campione (da 0,1 a 0,5 mL) anche prima della concentrazione.
- 9.1.2.3 Se si presume che il campione abbia una bassa concentrazione di legionelle si suggerisce l'uso del metodo basato sulla semina diretta della membrana (vedi Metodo ISO 11731-2:2004).
- 9.1.2.4 Filtrare il campione d'acqua attraverso membrane sterili di policarbonato o nylon o esteri misti di cellulosa con porosità pari a 0,22-0,45 μm poste su apparati filtranti di vario genere (sistemi composti da beute da vuoto o rampe per filtrazione).
- 9.1.2.5 Filtrare attraverso una pompa da vuoto, esercitando preferibilmente una pressione di circa 500-550 mm Hg (per evitare stress alle legionelle).

Si possono utilizzare più membrane in successione se il campione presenta difficoltà di filtrazione es. se risulta torbido o con materiali vari in sospensione.

- 9.1.2.6 Al termine della filtrazione, prelevare la membrana con pinzette sterili e porla in un contenitore di vetro o in provetta in plastica monouso sterile di capacità adeguata e richiudibile, contenente 10 mL di diluente (soluzione Ringer o Page o acqua distillata

sterile, vedere la composizione par. Terreni e diluenti, allegato 4 della Linea guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi, 79/CSR del 7/5/2015) o con l'acqua dello stesso campione. Si procede quindi al distacco dei microrganismi che sono stati trattenuti, pipettando ripetutamente il diluente sulla membrana, oppure mediante sfregamento della pipetta sulla membrana stessa, oppure si può procedere anche allo sminuzzamento della membrana con forbici sterili. In alternativa si può usare una piastra Petri di 90 mm o altro contenitore idoneo con 5-10 mL di diluente (soluzione Ringer o Page o acqua distillata sterile o acqua dello stesso campione), rimuovere i batteri adesi alla membrana con uno *scraper* o una spatola (passarlo almeno due volte sull'intera membrana) e trasferire poi il volume di diluente in una provetta di plastica monouso sterile.

Si procede poi ad una agitazione vigorosa per 2'.

In alternativa si possono utilizzare anche buste sterili dove si colloca la membrana con il diluente e poi si procede al massaggio con le dita attraverso la busta della membrana stessa per almeno 30" per rimuovere i batteri e ad un trattamento in bagno ad ultrasuoni (vedi punto successivo).

Se si possiede un bagno ad ultrasuoni è consigliabile trattare il concentrato da 2 a 10 minuti in alternativa al vortex; assicurarsi che il livello di diluente che copre la membrana sia sotto il livello dell'acqua nella vasca ad ultrasuoni. Il campione così ottenuto rappresenta il concentrato da utilizzare per l'inoculo. Dopo si segue quanto descritto dal 9.2.1 - 9.2.6 del presente documento

9.1.3 Procedura per campioni ambientali a matrice acquosa - centrifugazione

Il principio del metodo si basa sulla concentrazione di *Legionella* mediante centrifugazione.

➤ Eseguire la procedura analitica del Metodo 9.1.2 per tutte le fasi fino al punto 9.1.2.3.

Nota 1. Si suggerisce di utilizzare il metodo 9.1.3 solo per campioni che presentano difficoltà nella filtrazione perché molto torbidi e/o per la presenza di materiale corpuscolare. La centrifugazione viene effettuata con 200 ± 5 ml di campione a 6000 ± 100 g per 10 min oppure 3000 ± 100 g per 30 min tra 15 e 25 °C. Si elimina sterilmente e molto delicatamente il soprannatante e si risospende il deposito in 2-20 ml di soluzione Ringer o soluzione Page o acqua distillata sterile. E' consigliabile rimuovere il soprannatante mediante aspirazione con una pompa da vuoto o con una pipetta sterile, non per decantazione per evitare di perdere le legionelle. Registrare il volume finale, che rappresenta il campione concentrato.

Nota 2. Il presente metodo risulta molto critico a causa della possibile perdita di legionelle durante il processo di centrifugazione.

➤ Dopo la centrifugazione si segue quanto descritto dal 9.2.1-9.2.6 del presente documento.

9.1.4 Metodi per campioni ambientali a matrice non acquosa

9.1.4.1 Metodo C1 per depositi o sedimenti.

Risospendere la matrice con il minor volume possibile di acqua distillata sterile, soluzione Ringer o Page e agitare bene ed effettuare la semina su terreno selettivo come descritto per le matrici acquose. Sulle sospensioni si applica quanto descritto dal 9.2.1 - 9.2.6 del presente documento.

9.1.4.2 Metodo C2 per incrostazioni

Frantumare e tritare le incrostazioni in mortaio o mixer sterili, risospendere con il minor volume possibile di acqua distillata sterile soluzione Ringer o Page e agitare bene. ed effettuare la semina su terreno selettivo come descritto per le matrici acquose. Sulle sospensioni si applica quanto descritto dal 9.2.1 - 9.2.6 del presente documento.

9.1.4.3 Metodo C3 per biofilm

Agitare il tampone nella provetta contenente da 3-5 ml di acqua distillata sterile soluzione Ringer o Page e agitare bene per rimuovere il materiale raccolto. Sulle sospensioni si applica quanto descritto dal 9.2.1 - 9.2.6 del presente documento.

9.1.4.4 Metodo C4 per filtri

Lavare il filtro o parte di esso in acqua distillata sterile o soluzione Ringer o Page. Utilizzare il volume minimo necessario per evitare di diluire il campione. Se si dovesse rendere necessario l'utilizzo di volumi maggiori ai 20 mL effettuare una centrifugazione a 6000 g \pm 100 g per 10 min oppure 3000 g \pm 100 g per 30 min tra 15 °C e 25 °C. Si elimina sterilmente il sopranatante e si risospende il deposito in 2-20 ml di acqua distillata sterile o soluzione Ringer o soluzione Page. E' consigliabile rimuovere molto delicatamente il sopranatante mediante aspirazione con una pompa da vuoto o con una pipetta sterile, non per decantazione per evitare di perdere le legionelle. Sulle sospensioni si applica quanto descritto dal 9.2.1 - 9.2.6 del presente documento.

La presenza massiccia di flora interferente (es. funghi) anche dopo entrambi i trattamenti (calore e acido) non sempre permette di verificare concretamente l'eventuale presenza di *Legionella* nella piastra di semina con il rischio di falsi negativi, pertanto il ricorso a tale tipologia di analisi potrebbe non essere significativo.

Tutte le matrici ambientali ottenute dai paragrafi 9.1.2-9.1.4 possono essere conservate a +5°C \pm 3°C per 7 giorni.

9.2 Semina, incubazione ed esame delle piastre

Dividere il campione in esame in tre aliquote. Utilizzarne una senza alcun trattamento e trattare le altre due aliquote, una al calore (9.2.2) ed una con acido (9.2.3). **Nota 3.** *Questi trattamenti hanno una diversa funzione nel recupero delle legionelle da un campione ambientale. Il trattamento con acido ad esempio, spesso consente il recupero di quelle specie di legionelle (e. Legionella micdadei e Legionella anisa) più sensibili al calore, inoltre l'acidità della soluzione può facilitare la lisi delle amebe e quindi un recupero maggiore di legionelle in esse eventualmente presenti; il trattamento al calore inibisce la crescita di altri batteri resistenti agli antibiotici ed antifungini presenti nei terreni selettivi;*

- 9.2.1 Campione non trattato: effettuare la semina del campione tal quale. N.B. In presenza di epidemie si raccomanda la conservazione del rimanente concentrato fino alla completa esecuzione di tutte le indagini ambientali ed epidemiologiche).
- 9.2.2 Campione trattato al calore: prendere un'aliquota (es. 1 mL \pm 0.5 mL) di campione tal quale e metterlo in una provetta da centrifuga con tappo a vite ed incubare a 50 °C \pm 1 °C per 30 \pm 2 min.
- 9.2.3 Campione trattato con acido: con soluzione tamponata HCl-KCl a pH 2,2 (vedere la composizione nella nota dell'Allegato 2). In tale caso, centrifugare da 1 mL a 10 ml della sospensione ed aggiungere un ugual volume della soluzione tamponata acida, mescolare bene e lasciare a temperatura ambiente per 5 min. \pm 0,5 min.
- 9.2.4 Inoculare su una o due piastre del terreno di isolamento (6) da 0,1 a 0,5 mL di campione non trattato (9.2.1). Ripetere la stessa operazione per l'aliquota di campione trattato con il calore (9.2.2) e per l'aliquota trattata con acido (9.2.3)
Nota 4. *Qualora in occasione della prima lettura si rilevasse nei campioni ottenuti dai paragrafi 9.2. 1, 9.2.2 e 9.2.3 un' elevata presenza di legionelle o di flora contaminante, sarà necessario eseguire sul campione concentrato non trattato (9.2.1), diluizioni in base 10 (10-1 e 10-2 con soluzione Ringer o soluzione Page o acqua distillata sterile) ed eseguire, se necessario, di nuovo i trattamenti (9.2.2 e 9.2.3) come indicato in precedenza. Inoculare di nuovo il "campione di concentrato" (9.1.2) diluito non trattato e/o trattato su terreno selettivo.*
- 9.2.5 Incubare a 36 \pm 2°C in aerobiosi e in ambiente umido ponendo sulla parte inferiore dell'incubatore un contenitore con dell'acqua. L'incubazione può anche essere condotta in atmosfera al 2,5% di CO₂ oppure in microaerofilia.
- 9.2.6 Esaminare le piastre, almeno tre volte ad intervalli da 2 a 4 giorni, sino a 10 giorni di incubazione (ISO 11731:1998 p. 9.2.6 pag. 9).

Le piastre relative al campione bianco devono essere esenti da crescita microbica.

9.3 Conferma e identificazione delle colonie di *Legionella*

Vedi norma ISO 11731:1998 con le precisazioni di seguito indicate in base all'Allegato 5 della Linee Guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi (79/CSR del 7/5/2015) "Prova differenziale preliminare".

Considerare una piastra come negativa solo dopo almeno 10 giorni di incubazione.

Nel caso di presenza di colonie di *Legionella* presunte (vedi Allegato 5 della Linee Guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi (79/CSR del 7/5/2015), "Identificazione e conservazione di *Legionella*"), per avere una discreta rappresentatività delle colonie presenti in un campione, analizzare 5 o più colonie per ogni piastra seminata cercando di prelevare quelle che presentano un aspetto diverso. Nel caso di piastre con presenza di colonie tipiche tra 1 e 5 analizzare tutte le colonie. **Nota 5.** *In presenza di cluster o di focolai epidemici, al fine di consentire una maggiore attendibilità del confronto genomico tra i ceppi ambientali e quelli di origine umana, si suggerisce di analizzare un numero di colonie ≥ 5 . Inoltre, in questi casi è necessario conservare i ceppi ambientali isolati e inviarli al più presto al Laboratorio Nazionale di Riferimento.*

Si procederà quindi all'identificazione (Allegato 5 della Linee Guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi).

Per le conferme, prendere in considerazione tra tutte le piastre seminate (del campione non trattato e trattato con acido e con calore) quella che alla diluizione più bassa presenta un numero di colonie non superiore a 150.

9.3.1 Prova differenziale preliminare

Effettuare subcolture di ogni colonia tipica sia su BCYE agar, sia su BCYE agar senza L-cisteina o su comune terreno di coltura. Incubare a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 48 ore.

Le colonie di *Legionella* presenteranno crescita su BCYE agar e assenza di crescita su BCYE agar senza L-cisteina o sul terreno di crescita per germi comuni, per l'incapacità di *Legionella* di moltiplicarsi in assenza di L-cisteina. (*L. oakdrigensis* e *L. spiritensis* richiedono L-cisteina e ferro per l'isolamento primario, ma possono crescere debolmente anche in terreno privo di L-cisteina. Pertanto deve essere accuratamente osservata la differenza di crescita nel terreno con e senza cisteina).

Questa identificazione presuntiva deve essere confermata attraverso l'utilizzazione di reagenti specifici (vedi paragrafo sottostante) oppure attraverso l'amplificazione e il sequenziamento di geni (*mip*, *rDNA*).

9.3.2 Identificazione

Vedi norma ISO 11731:1998 e all'Allegato 5 della Linee Guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi (79/CSR del 7/5/2015), "Identificazione definitiva", con le seguenti precisazioni.

9.3.2.1 L'identificazione della specie e del sierogruppo di *Legionella* può essere effettuata su base antigenica con test sierologici che utilizzano anticorpi policlonali o preferibilmente monoclonali mediante saggi di:

- a) agglutinazione al lattice;
- b) agglutinazione diretta su vetrino;
- c) test immunocromatografico;
- d) immunofluorescenza diretta o indiretta.

Tutti questi reagenti sono disponibili in commercio. Utilizzarli secondo le indicazioni del produttore.

Nota Bene. Utilizzare kit che identifichino il maggior numero di specie di *Legionella* conosciute (vedi allegato 1 del 79/CSR del 7/5/2015) oppure scegliere più di un kit al fine di comprendere tutte le specie e così arrivare all'identificazione definitiva. Se con un kit non si riesce a identificare la colonia presunta di *Legionella*, occorre utilizzare un altro sistema di identificazione come indicato dal paragrafo 9.3.2.1 al paragrafo 9.3.2.4.

9.3.2.2 L'identificazione di *Legionella* è normalmente eseguita mediante i comuni test di identificazione sopra indicati. Tuttavia, qualora l'esame colturale determini l'isolamento di colonie considerate legionelle e mediante i test convenzionali non fosse possibile arrivare ad una identificazione definitiva, l'identificazione si può effettuare attraverso saggi di biologia molecolare. Tali metodiche devono essere svolte in locali del laboratorio opportunamente dedicati.

- a) L'identificazione può essere eseguita mediante analisi della sequenza del gene *mip*, utilizzando il DNA batterico purificato dalla colonia isolata. Il protocollo utilizzato a questo scopo è stato elaborato e standardizzato dal gruppo di lavoro europeo (ESGLI)

e le sequenze ottenute saranno confrontabili con quelle disponibili nel database a questo [dedicato \(http://bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php\)](http://bioinformatics.phe.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php) e risalire alla specie di *Legionella* in esame. Nella nota alla pagina 104 dell'Allegato 5 della Linee Guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi (79/CSR del 7/5/2015) è riportato un breve protocollo.

- b) L'identificazione di colonie presunte può essere anche effettuata attraverso saggi di PCR, convenzionale o Real Time, che potranno essere eseguiti utilizzando sistemi in "house" o kit commerciali, purché conformi alla ISO 12869 (2012).

9.3.2.3 L'identificazione può essere effettuata anche mediante spettrometria di massa MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry) una tecnica analitica che, mediante idonea strumentazione esistente in commercio, consente di misurare in maniera estremamente accurata il peso molecolare di macromolecole di interesse biologico e di determinare la loro identità in base al rapporto massa/carica (m/z). Questo tipo di analisi, riferendosi ad opportune banche dati, consente di identificare profili che sono tipici per ciascuna specie di *Legionella*. Utilizzare questo metodo secondo le indicazioni fornite dal produttore.

9.3.2.4 L'identificazione, qualora non si avesse la disponibilità di uno dei metodi sopra descritti, può essere effettuata dal Laboratorio Nazionale di Riferimento per legionelle.

10. Espressione dei risultati

10.1 Espressione dei risultati per matrice acquosa

Si effettuerà una valutazione quantitativa (Unità Formanti Colonia/Litro, UFC/L, in base al numero di colonie contate per piastra, al numero delle colonie confermate tra quelle sottoposte a conferma ed alla concentrazione effettuata sul campione originale, tenendo conto anche delle eventuali diluizioni effettuate successivamente.

Per il calcolo finale, per determinare il numero di UFC di *Legionella* presenti nel campione, si deve considerare la piastra del campione tal quale (non trattato) e trattato (acido e/o calore) che presenta il maggior numero di colonie confermate, nell'ambito dell'intervallo di lettura accettabile (≤ 150 UFC).

Calcolare il numero delle unità formanti colonia di *Legionella* presenti in 1 litro (UFC/1000 mL) in base al numero delle colonie confermate sulla piastra considerata, tenendo conto della diluizione, dell'inoculo utilizzato e del volume filtrato, secondo la formula:

$$C_s = \frac{k \times z \times V_s}{n \times V_t \times d} \times \frac{1}{c}$$

dove:

C_s numero totale dei microrganismi confermati nel volume di riferimento del campione V_s (1000 mL);

k numero di colonie confermate tra quelle sottoposte a conferma (n);

n numero di colonie tipiche sottoposte a conferma;

z numero di colonie tipiche contate sulla piastra considerata;

V_t volume di campione o della diluizione inoculato su piastra (in mL);

V_s volume di riferimento per l'espressione dei risultati (1000 mL);

d diluizione utilizzata;

c fattore di concentrazione (es. 1000 mL concentrati in 10 mL fattore di concentrazione = 100).

Riportare i risultati con un'approssimazione di due cifre significative: se la terza cifra è inferiore a 5 non modificare la cifra precedente; se la terza cifra è maggiore o uguale a 5, incrementare di una unità la cifra precedente.

Esprimere i risultati preferibilmente con un numero compreso tra 1,0 e 9,9 moltiplicato per l'appropriato esponente in base 10 o l'intero numero arrotondato con due cifre significative.

L'assenza di *Legionella* sarà riportata come <100 UFC/L se il volume esaminato è un litro, il volume di concentrato è 10 mL ed il volume dell'inoculo è 0,1 mL. Tale limite soddisfa i requisiti richiesti dalle finalità di prevenzione sanitaria indicate nei documenti di riferimento dove la concentrazione di 100 UFC/L è la soglia al di sotto della quale non è necessario alcun intervento.

Volumi diversi indicheranno limiti di quantificazione diversi.

Quando non è possibile avere un campione d'acqua di un litro (es. campionamenti effettuati nelle UTA o nei circuiti di riuniti odontoiatrici, ecc.) esprimere il risultato indicando le UFC/volume campionato.

Nota. Se attraverso le procedure di analisi ed identificazione si ottengono dati di quantificazione prima dei 10 giorni si possono comunicare al committente al fine di



consentire le idonee misure di prevenzione e controllo a tutela della salute pubblica. I risultati ottenuti saranno riportati come “preliminari” e dovranno essere successivamente confermati completando il periodo di incubazione (10 giorni).

10.2 Espressione dei risultati per matrice non acquosa

Per campioni ambientali a matrice non acquosa (depositi, sedimenti, incrostazioni, biofilm e filtri), l’espressione dei risultati sarà qualitativa ed espressa come: rilevata/non rilevata nella matrice esaminata.

10.3 Incertezza di misura

Vedi Allegato 4 della Linee Guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi (79/CSR del 7/5/2015), “Incertezza di misura”.

Normalmente al risultato non viene associata l’incertezza di misura in quanto non significativa ai fini del confronto con i limiti di intervento indicati nel presente documento.

11. Rapporto di prova

Vedi norma ISO 11731:1998.