



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 11731-2: 2004 Water quality — Detection and enumeration of *Legionella* Part 2: “Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts” 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	6
9.1 Filtrazione di campioni di acqua mediante membrana.....	6
9.2 Incubazione.....	7
.....	7
9.3 Esame delle piastre.....	7
.....	7
9.4 Conferma e identificazione delle colonie di <i>Legionella</i>	7
9.4.1 Prova differenziale preliminare	
9.4.2 Identificazione definitiva	
10. Espressione dei risultati	9
11. Rapporto di prova	10



Premessa

Il presente documento viene emesso a supporto del metodo ISO 11731-2:2004 per permettere ai laboratori di eseguire la ricerca, quantificazione e identificazione di *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 costituiscono una modifica sostanziale al metodo ISO 11731-2.

Il laboratorio, nella dichiarazione del metodo utilizzato nel rapporto di prova, oltre al riferimento ISO 11731-2:2004 può riportare, quando applicabile, anche un riferimento al presente documento.

1 Scopo

Vedi norma ISO 11731-2:2004, con le seguenti precisazioni: nel presente documento sono riportate le procedure per la ricerca quantificazione e identificazione di *Legionella* in campioni d'acqua con basse concentrazioni di *Legionella*.

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 11731-2:2004.

4. Misure di sicurezza

Vedi norma ISO 11731-2:2004.

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 con posa diretta su terreno di coltura. Dopo filtrazione, il filtro è trattato con tampone acido aggiunto direttamente nel sistema di filtrazione per ridurre la crescita di microrganismi non appartenenti al genere *Legionella*. Il filtro è trasferito su piastra di agar selettivo per *Legionella* ed incubato.

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, ISO 11731-2:2004, 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. Scongelare 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 11731-2:2004.

8. Campionamento

8.1 Contenitori

Vedi norma ISO 11731-2:2004 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 11731-2:2004 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 i 4 giorni dal prelievo.

9. Procedura

9.1 Filtrazione di campioni di acqua mediante membrana

Vedi norma ISO 11731-2:2004 e 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". -Concentrazione per filtrazione con posa diretta della membrana sul terreno di coltura".

La procedura descritta dal punto 9.1 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.

9.2 Incubazione

Vedi norma ISO 11731-2:2004 e l'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 - Concentrazione per filtrazione con posa diretta della membrana sul terreno di coltura".

9.3 Esame delle piastre

Vedi norma ISO 11731-2:2004.

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

9.4 Conferma e identificazione delle colonie di *Legionella*

Vedi norma ISO 11731-2:2004 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), "Concentrazione per filtrazione con posa diretta della membrana sul terreno di coltura".

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 colonie¹ cercando di prelevare quelle che presentano un aspetto diverso. In caso di piastre con presenza tra 1 e 5 colonie tipiche di *Legionella* per avere una discreta rappresentatività delle colonie presenti in un campione analizzare tutte le colonie. Si procederà quindi alla conferma e all'identificazione (Allegato 5 della Linee Guida "Identificazione e conservazione di *Legionella*").

9.4.1 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 °C ±2 °C per 48 ore.

¹ 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

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*).

9.4.2 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.

9.4.2.1 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.

9.4.2.2 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 e da personale adeguatamente addestrato.

- 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).

9.4.2.3 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.

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

10. Espressione dei risultati

Vedi norma ISO 11731-2:2004 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), "Filtrazione con posa diretta della membrana su terreno di coltura".

Tra tutte le piastre in coltura con numero di colonie ≤ 100 , selezionare per il conteggio quella che presenta il maggior numero di colonie ascrivibili a *Legionella*.

Eseguire il conteggio solo su piastre che presentano un numero di colonie caratteristiche non superiore a 100 UFC. Al fine di soddisfare la necessità del confronto con il riferimento normativo anche per i piccoli numeri (< 10 colonie), calcolare il numero delle unità formanti colonia di *Legionella* presenti in 1 litro (UFC/L) in base al numero delle colonie contate

sulla piastra considerata, al numero delle colonie confermate tra quelle sottoposte a conferma, al volume filtrato, secondo la seguente formula:

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

dove

- Cs numero totale dei microrganismi confermati nel volume di riferimento del campione Vs (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 membrana;
- Vt volume di campione saggiato (in mL);
- Vs volume di riferimento per l'espressione dei risultati (1000 mL).

Se in tutte le piastre seminate non vengono riscontrate colonie ovvero non vengono confermate le eventuali colonie caratteristiche (sospette), esprimere il risultato come riportato nella tabella seguente:

Volume filtrato (mL)	Risultato in UFC/L
≥ 1000	< 1
< 1000 ÷ ≥ 100	<10
< 100 ÷ ≥ 10	<100

Nota: Volumi d'acqua inferiori ad un litro: 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.

10.1 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", con le seguenti precisazioni.

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_2:2004.