

 ASL Napoli 1 Centro	PROCEDURA OPERATIVA Ricerca Legionella nei campioni di acqua	Pagina Rev. 1 Data 01/07/2015 P.O.03
PSI Napoli Est UOC Patologia Clinica		

- 1.Scopo e campo di applicazione**
- 2.Diagramma di flusso**
- 3.Riferimenti normativi**
- 4.Descrizione attività**
- 5.Comunicazione dei risultati ed archiviazione**
- 6.Allegati**

redatto da:	verificato da:
R.Galdi	F. Proietti

 <p>ASL Napoli 1 Centro</p>	<p>PROCEDURA OPERATIVA</p> <p>Ricerca Legionella nei campioni di acqua</p>	<p>Pagina</p> <p>Rev. 1 Data 01/07/2015</p> <p>P.O.03</p>
<p>PSI Napoli Est UOC Patologia Clinica</p>		

SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Come da disposizione prot.75 del 8-03-2012 avente per oggetto “ Affidamento controllo per Legionella”, il laboratorio del PSI Napoli Est è stato individuato quale centro di riferimento per la raccolta e l’esame dei campioni delle acque di tutte le strutture dell’ Azienda relativamente alla ricerca delle legionelle.

La procedura operativa utilizzata a tutt’oggi viene pertanto rivisitata per essere aggiornata e confermata alle nuove linee guida.

Tipologia di controlli e periodicità’

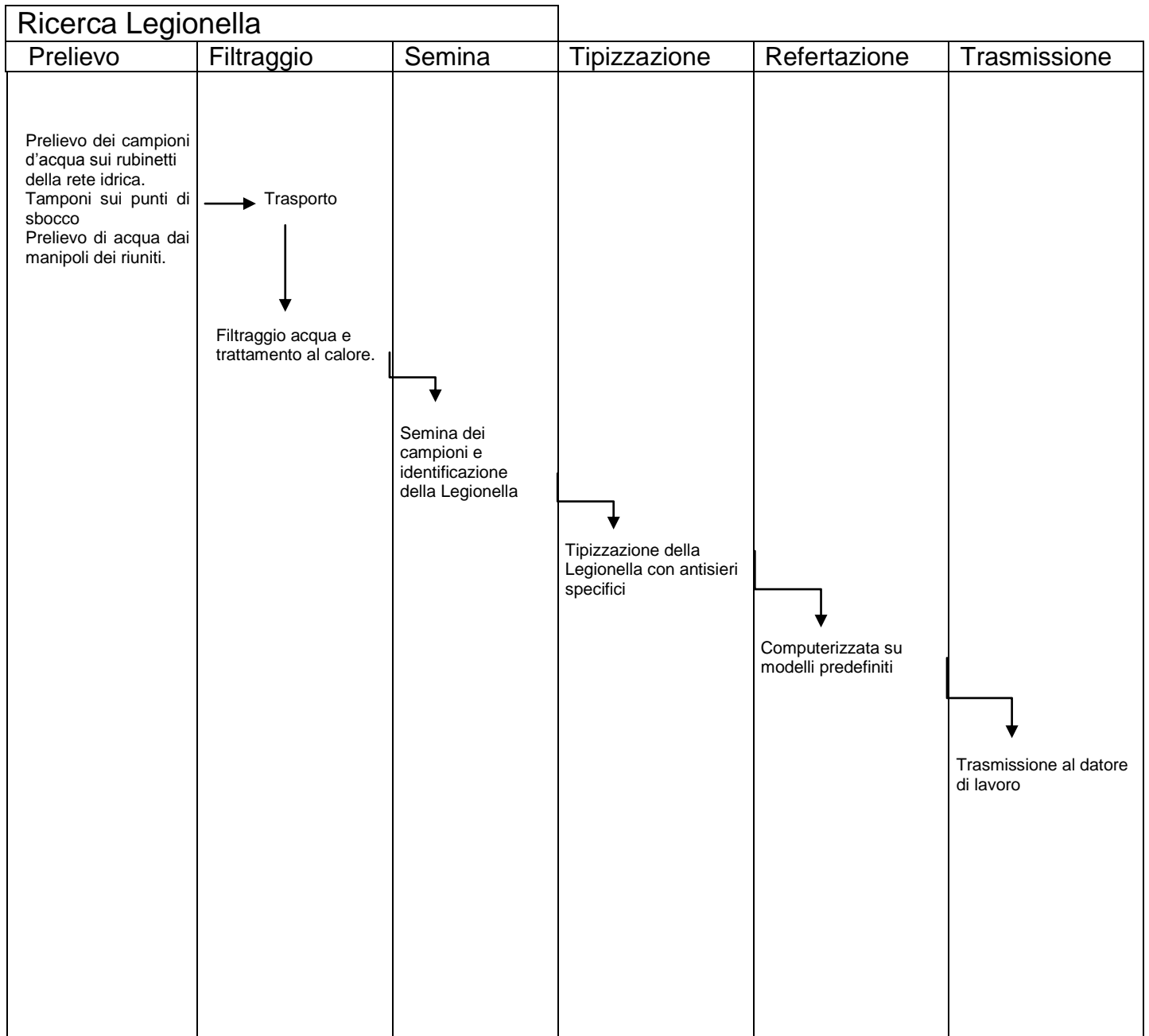
I controlli effettuati saranno di due tipi:

- **Controlli sulla rete idrica:**
 - Ricerca quantitativa della legionella nei punti di sbocco dei circuiti dell’acqua calda e/o dell’acqua fredda;
 - ricerca quantitativa della legionella nei boiler per la fornitura dell’acqua calda;
 - ricerca quantitativa nei serbatoi di accumulo di acqua
- **Controlli dei riuniti odontoiatrici:**
 - Ricerca quantitativa dal manipolo nebulizzatore dei riuniti odontoiatrici

Per quanto riguarda la periodicità dei controlli, il calendario sarà organizzato in modo da prevedere due controlli annuali per tutte le strutture mentre sarà cura dei Direttori Sanitari segnalare la presenza di reparti a rischio molto elevato per i quali è previsto controllo trimestrale (linee guida § 3.4 pag. 43-45)

Allo stesso modo il Direttore Sanitario che avrà effettuato eventuali bonifiche dovrà farne comunicazione al laboratorio in maniera tale da attivare i controlli post bonifica.

DIAGRAMMA DI FLUSSO



 ASL Napoli 1 Centro	PROCEDURA OPERATIVA Ricerca Legionella nei campioni di acqua	Pagina Rev. 1 Data 01/07/2015 P.O.03
PSI Napoli Est UOC Patologia Clinica		

RIFERIMENTI NORMATIVI

- **Linee guida per la prevenzione ed il controllo della Legionellosi Conferenza Stato-Regioni del 7-05-2015**

“Documento che riunisce, aggiorna ed integra in un unico testo tutte le indicazioni riportate nelle precedenti linee guida nazionali e normative e pertanto le sostituisce integralmente”

 <p>ASL Napoli 1 Centro</p>	<p>PROCEDURA OPERATIVA</p> <p>Ricerca Legionella nei campioni di acqua</p>	<p>Pagina</p> <p>Rev. 1 Data 01/07/2015</p> <p>P.O.03</p>
<p>PSI Napoli Est UOC Patologia Clinica</p>		

DESCRIZIONE ATTIVITÀ

Campionamento

I punti da campionare saranno indicati dalla Direzione della struttura in quanto la scelta non può prescindere da opportune valutazioni che comprendono conoscenza delle caratteristiche dell'impianto idrico nonché valutazione del rischio legionella derivanti dalla tipologia dei reparti. (linee guida - gestione del rischio § 3.1 pag. 3)

Modalità di prelievo

Durante la fase di prelievo prestare la massima attenzione a mantenere le condizioni di sterilità del campione eliminando qualsiasi possibilità di contaminazione dello stesso con eventuali altri campioni o con l'ambiente ed utilizzare opportuni DPI.

Per l'esecuzione dei monitoraggi di autocontrollo di routine si procede con la seguente modalità:

1. Far scorrere l'acqua per almeno 1 minuto
2. Chiudere il flusso e flambare lo sbocco
3. Misurare la temperatura dell'acqua ponendo il termometro nel flusso d'acqua aspettando che questa raggiunga un valore costante
4. Raccogliere almeno 1 litro di acqua in una bottiglia sterile con tappo a vite, contenente sodio tiosolfato 0.01%
5. Numerare ciascun campione e annotare tutti i dati sull'apposito modulo di campionamento (All.1)

Qualora si vogliano campionare separatamente la rete idrica e il punto di sbocco si procede come segue:

1. Prima di aprire il rubinetto, con un tampone sterile si raccoglie il materiale depositato sul filtro rompigitto del rubinetto o nell'interno del bulbo delle docce; il tampone viene poi reinserito nel suo alloggiamento, dopo aver versato nello stesso un poco di acqua sterile (circa 2 ml).
2. Si esegue la raccolta del campione d'acqua secondo la modalità prima descritta escludendo quindi il filtro o, nel caso di doccia, il bulbo.

 <p>ASL Napoli 1 Centro</p>	PROCEDURA OPERATIVA Ricerca Legionella nei campioni di acqua	Pagina Rev. 1 Data 01/07/2015
<p>PSI Napoli Est UOC Patologia Clinica</p>		P.O.03

Trasporto e conservazione

I campioni devono essere trasportati e conservati a temperatura ambiente al riparo dalla luce, tenendo separati i campioni di acqua fredda da quelli di acqua calda. L'analisi deve essere avviata entro 24 ore dal prelievo. In caso contrario il campione deve essere conservato a $+5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ non oltre i 4 giorni dal prelievo.

Modalità di esecuzione degli esami

Acqua

Una volta pervenuto in laboratorio, il campione di acqua deve essere filtrato con apposita pompa di filtraggio utilizzando una membrana con porosità 0,22–0.45 micron procedendo nel modo seguente:

1. Agitare bene il campione d'acqua per staccare le legionelle che aderiscono alle pareti del contenitore e versare 10 ml dello stesso in un contenitore con tappo a vite.
2. Prelevare una membrana con pinzetta sterile e poggiarla sulla rampa di filtraggio.
3. Filtrare il campione d'acqua ad una pressione di circa 500-550 mm Hg (per evitare stress alle legionelle).
4. Prelevare la membrana con pinzetta sterile e poggiarla nel contenitore, preparato in precedenza e opportunamente identificato.
5. Tutto quanto depositato sulla membrana deve essere eluito usando una bacchetta sterile con punta arrotondata o un vortex in maniera da recuperare le legionelle adese.
6. La sospensione così ottenuta va suddivisa in due aliquote di cui una sola, di circa 2 ml, va posta in bagnomaria a $50 (\pm 1)^{\circ}\text{C}$ per $30 (\pm 2)$ minuti.
7. A questo punto si piastrano 100 μl di entrambi i campioni su terreno MWY e si incuba a $36 (\pm 2)^{\circ}\text{C}$ in termostato, in ambiente umido, conservando il campione rimanente a $+5^{\circ}\text{C}$.
8. Le piastre vanno osservate ogni 24 ore e fino a 10 giorni per verificare l'eventuale crescita batterica.
9. Nel caso in cui dopo 24-48 h di incubazione il campione dovesse presentare una crescita eccessiva di colonie, bisogna riprendere il campione conservato, diluirlo opportunamente con acqua distillata sterile e ripetere la procedura dal punto 6.

Tamponi

- Agitare bene il tampone nell'acqua contenuta nell'apposito alloggio in modo da eluire tutto il materiale raccolto.
- Suddividere in due aliquote la sospensione, trattarne una al calore e continuare come dal punto 6.

 <p>ASL Napoli 1 Centro</p>	<p>PROCEDURA OPERATIVA</p> <p>Ricerca Legionella nei campioni di acqua</p>	<p>Pagina</p> <p>Rev. 1 Data 01/07/2015</p> <p>P.O.03</p>
<p>PSI Napoli Est UOC Patologia Clinica</p>		

Alla fine dei 10 giorni, se non si è verificata crescita batterica, il campione può essere considerato negativo.

In caso contrario, bisogna individuare eventuali colonie sospette:

Colonie piccole, di colore bianco-grigio, leggermente convesse, con bordi a vetro smerigliato se osservate con luce laterale.

Identificazione della Legionella

- Subcolturare le colonie sospette su agar BCYE e su agar BCYE senza cisteina o, in alternativa, anche agar Mc Conkey
- Incubare a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per 48 h.
- Osservare l'eventuale presenza di colonie che siano cresciute solo su BCYE con cisteina e non sull'altro terreno.
- Su queste colonie andrà effettuato il test di agglutinazione
- Il test di agglutinazione consente di distinguere la Legionella pneumophila dalle altre legionelle (spp.) ed inoltre di individuare il sierogruppo 1 e gli altri sierogruppi (2-14).

Espressione dei risultati

Per la conta va considerata la piastra del campione (trattato o non trattato) che presenta il maggior numero di colonie confermate.

Il numero delle colonie di Legionella ottenute va quindi rapportato alla quantità di acqua prelevata (1litro) e alla concentrazione effettuata con la filtrazione: il risultato sarà quindi espresso in ufc/l.

L'assenza di legionella sarà riportata come <100 ufc/l

Se il campione di acqua è inferiore a 1 litro il risultato si esprime in ufc/volume campionato.

 ASL Napoli 1 Centro	PROCEDURA OPERATIVA Ricerca Legionella nei campioni di acqua	Pagina Rev. 1 Data 01/07/2015 P.O.03
PSI Napoli Est UOC Patologia Clinica		

COMUNICAZIONE DEI RISULTATI ED ARCHIVIAZIONE

I risultati, trascritti sul relativo modello di risposta(All.2) computerizzato e firmato dal dirigente responsabile, sono consegnati al Direttore del laboratorio il quale li invia :

1. Al Direttore Generale
2. Al Direttore Sanitario
3. Al Responsabile UOC Prevenzione e Protezione della ASL

L' archiviazione dei dati è computerizzata e conservata dal Dirigente e dal Direttore.
Rimane inoltre copia cartacea di tutti i fogli di lavoro rappresentati da una agenda a fogli non estraibili.

ALLEGATI

1. All.1 P.O. 03 Schema di campionamento
2. All.2 P:O. 03 Modello di referto

	PROCEDURA OPERATIVA Ricerca Legionella nei campioni di acqua	Pagina Rev. 1 Data 01/07/2015
PSI Napoli Est UOC Patologia Clinica		P.O.03

Campione di: **acqua** ■ **biofilm** ■ **altro** ■

Prelevato ilQuantità : **1 Litro** ■ **altro** ■

Presso.....

N° Camp.	Sito prelievo	Scorrimento		T °C
		SI	NO	
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				

Campionamento effettuato a seguito di :

- controllo in seguito ad un caso ■
- cluster ■
- epidemia, altro (specificare) ■
- controllo di routine ■

Note.....
.....

Inizio analisi: data..... Ora.....

Presso.....Firma.....



**Ricerca Legionella
nei campioni di acqua**

Rev. 1
Data 01/07/2015

P.O.03

Campionamento n.

Struttura

Data

NOTE:

Ricerca Legionella spp.

PUNTO PRELIEVO	T (°C)	ESITO	
		Legionella spp.	Ufc/L

In assenza di casi di malattia e per concentrazioni di Legionella inferiori a 1000 ufc/l, le Linee Guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi non prevedono interventi di disinfezione dell'impianto tranne che per i reparti ad alto rischio **(Linee guida Conferenza Stato-Regioni del 7-05-2015)**

Data