# Legionella

## Metodi microbiologici colturali e molecolari

GENERON
Food Safety in our Genes

Le legionelle sono presenti negli ambienti acquatici naturali e artificiali: acque sorgive, comprese quelle termali, fiumi, laghi, fanghi, ecc. Da questi ambienti esse raggiungono quelli artificiali come condotte cittadine e impianti idrici degli edifici, quali serbatoi, tubature, fontane e piscine, che possono agire come amplificatori e disseminatori del microrganismo, creando una potenziale situazione di rischio per la salute umana.

**La maggior parte dei casi di legionellosi sono stati attribuiti all'inalazione di particelle di acqua aerodisperse, contenenti batteri provenienti da torri di raffreddamento o unità di umidificazione dell'aria; contaminazione di impianti di acqua potabile; apparecchi sanitari, fontane e umidificatori ultrasonici.**
Focolai epidemici si sono ripetutamente verificati in ambienti collettivi a residenza temporanea, come ospedali o alberghi, navi da crociera, esposizioni commerciali, ecc.

**Esistono due norme a cui fare riferimento per l'analisi di Legionella:**

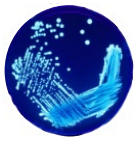
**ISO 11731:2017 Qualità dell'acqua – Conteggio di Legionella**
La norma specifica i metodi colturali per l'isolamento di stipiti batterici riferibili al genere Legionella e per la determinazione della relativa carica in campioni di acqua. Questi metodi sono applicabili a qualunque tipo di acqua, comprese le acque potabili, naturali, industriali e di scarico. Possono essere utilizzati per matrici correlate all'acqua, quali biofilm, sedimenti, etc. Non tutte le specie di Legionella risultano coltivabili; pertanto, i metodi riportati nella presente norma, non sono in grado di rilevare tutte le specie di Legionella.

**ISO/TS 12869:2019 Qualità dell'acqua – Rilevamento e quantificazione di Legionella via Real-Time PCR dopo concentrazione**
La norma specifica un metodo per il rilevamento di *Legionella* spp. e *pneumophila* basato sull'utilizzo della PCR quantitativa. Nella norma vengono specificati i requisiti tecnici generali, le performance minime e i controlli di qualità necessari. La norma è applicabile a qualsiasi tipo d'acqua ed i risultati vengono espressi in unità genomiche per litro.

La ricerca di *Legionella* si può effettuare con metodo colturale e/o con metodo Real-Time PCR (qPCR). L'anello di giunzione tra questi due approcci è rappresentato dall'utilizzo della PCR per la conferma e la sierotipizzazione delle colonie isolate su piastra

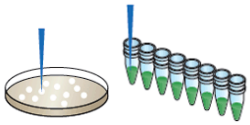
Preparazione del campione

Isolamento su terreno selettivo (GVPC)



Conferma *Legionella* spp. su terreno selettivo (BCYE)

Conferma e sierotipizzazione di *L. pneumophila* su Latex

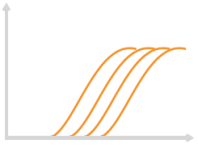


Conferma e sierotipizzazione di *L. pneumophila SG1–SG2-16* con Colony Real-Time PCR Generon PATHfinder

Preparazione del campione

Estrazione del DNA con Kit Bio-Rad Aquadien™

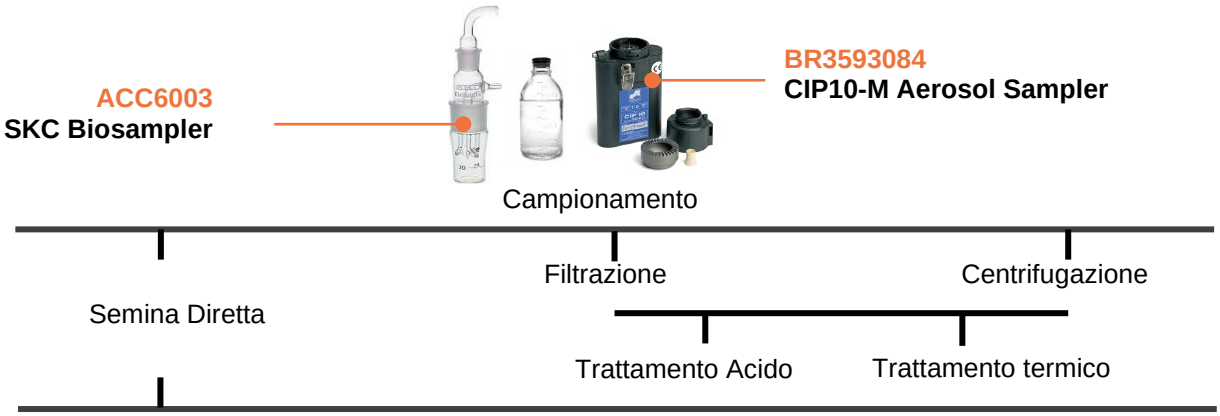
Ricerca del DNA di *Legionella* spp. o *L. pneumophila* e loro eventuale quantificazione con kit Real-Time PCR Bio-Rad iQ-Check



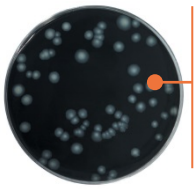
Analisi dei dati

## Metodo colturale (durata 10-13 giorni)

A livello internazionale è diventata vigente la norma ISO 11731:2017 “Water quality - Enumeration of Legionella” che sostituisce le precedenti ISO 11731-1:1998 e 11731-2: 2004 integrandole con un nuovo terreno di coltura per campioni sospetti con alta concentrazione di Legionella (oltre $10^4$ CFU/litro). Le matrici ambientali che vengono generalmente utilizzate per la ricerca di Legionella in campioni ambientali sono: acqua, sedimenti, biofilm. Il processo analitico è illustrato di seguito:

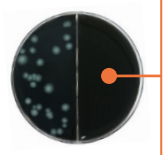



**Selezione di Legionella:** si utilizzano terreni ad alto tenore di antibiotici come il GVPC e il MWY per inibire la crescita della flora interferente. Incubazione per 7-10 giorni a 36°C.



| | |
|---|---|
| TMB_GVPC_P60_10 | **Legionella GVPC** (10x60 mm Petri) |
| TMB_GVPC_P90_10 | **Legionella GVPC** (10x90 mm Petri) |
| TMB_LMWY_P90_10 | **Legionella MWY Agar** (10x90 mm Petri) |
| TMB_BCYEAB_P90_10 | **Legionella BCYE + AB Agar** (10x90 mm Petri) |

**Conferma di *Legionella* spp.:** si utilizza il terreno BCYE supplementato con L-cysteina. Legionella non è in grado di crescere in assenza di L-cysteina e quindi la semina differenziale in terreno non supplementato risulta molto utile ad ulteriore conferma. Incubare per 2 giorni a 36°C.



| | |
|---|---|
| TMB_BCYE_P90_10 | **Legionella BCYE Agar** (10x90 mm Petri) |
| TMB_BCYEBIP_P90_10 | **Legionella BCYE Agar Bi-plates** (10x90 mm Petri) |
| TMB_BCYENCY_P90_10 | **Legionella BCYE without cysteine Agar** (10x90 mm Petri) |

**Conferma di *Legionella pneumophila*:** l’ultimo step nell’analisi è l’identificazione delle colonie di *L.pneumophila* e la loro serotipizzazione (ne esistono 16 sierogruppi dei quali il SG1 risulta essere il più virulento). Si possono utilizzare più approcci: il metodo di immuno-agglutinazione ed il metodo colony PCR (vedi ISO11731 Annex G).

**L. pneumophila Latex Kit, SG 1 and 2–15, 50 tests** BR3562790
**Legionella pneumophila and Species Latex Kit, 50 tests** BR3562795

PMB15D-SG **PATHfinder Legionella Colony ID 4-plex kit**

## Metodo molecolare (durata 4 ore)

I metodi colturali richiedono purtroppo più di 7 giorni per fornire risultati. Una **soluzione rapida è offerta dall'utilizzo della tecnica Real-Time PCR (qPCR)**. Le linee guida internazionali indicano che un campione risultato negativo in qPCR deve essere considerato negativo senza ulteriore conferma colturale; un campione che risulti positivo va invece confermato e conteggiato con il metodo colturale in quanto la qPCR non dà informazioni sulla vitalità dei batteri.

**ACC6003**
**SKC Biosampler**

**BR3593084**
**CIP10-M Aerosol Sampler**

Campionamento

Estrazione e purificazione del DNA con il kit Bio-Rad Aquadien

Rimozione del DNA di cellule non vitali

**BR3578121** **Aquadien Kit, 96 tests**
**BR3594970** **Free DNA removal kit**

Analisi molecolare

**BR3578104** **iQ-Check Screen Legionella spp. Kit, 96 tests**
**BR3578105** **iQ-Check Screen L. pneumophila Kit, 96 tests**

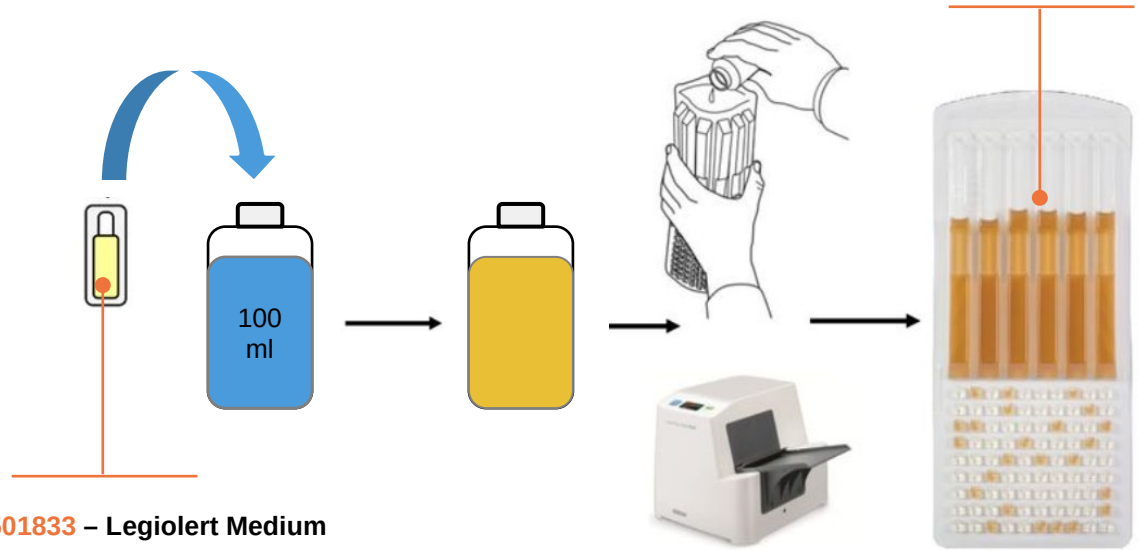
**BR3578102** **iQ-Check Quanti Legionella spp. Kit, 96 tests**
**BR3578103** **iQ-Check Quanti L. pneumophila Kit, 96 tests**

**PMB15D-SG-50**
**PATHfinder 4-Plex Kit Real-Time PCR per ricerca di Legionella Spp/L.pneumophila/L.pneumophila SG1 (secondo ISO12869)**

## Metodo MPN

Il kit IDEXX Legiolert, validato AFNOR come equivalente al metodo ISO11731, consente di conteggiare in 7 giorni *Legionella pneumophila*.
Il kit si caratterizza per la grande semplicità d'uso; non è richiesta alcuna filtrazione ed in soli due minuti il campione è pronto per esser incubato. Al termine del periodo di incubazione basta conteggiare i pozzetti che si sono colorati nella Quanti-Tray ed il gioco è fatto. I pozzetti sono perforabili in modo da identificare con metodo latex o colony PCR l'eventuale presenza di *Legionella pneumophila* serogruppo 1.

**X501830 – Legiolert QuantiTray**




**X501833 – Legiolert Medium**
**X501828 – Legiolert Supplemento per acque potabili**
**X501829 – Legiolert Supplemento per acque non potabili**

Incubazione 7 giorni a 39°C

**Generon** grazie al proprio laboratorio di R&S ed alla collaborazione con partner internazionali propone una soluzione completa per la ricerca di *Legionella* che contempla:

- Prodotti per il campionamento e la filtrazione
- Terreni di coltura pronti all'uso contemplati dalla norma ISO11731
- Kit di enumerazione rapida di Legionella pneumophila certificati AFNOR come equivalenti alla norma ISO11731
- Kit di conferma contemplati dalla norma ISO11731
- Kit di ricerca e quantificazione di *Legionella* spp. e *pneumophila* con tecnica Real-Time PCR certificati AFNOR NF T90-471 sviluppati secondo lo standard ISO/TS 1286

**Generon S.p.A.**
Via San Geminiano 4
41030 San Prospero (MO)
Tel. 059 8637161

**www.generon.it**