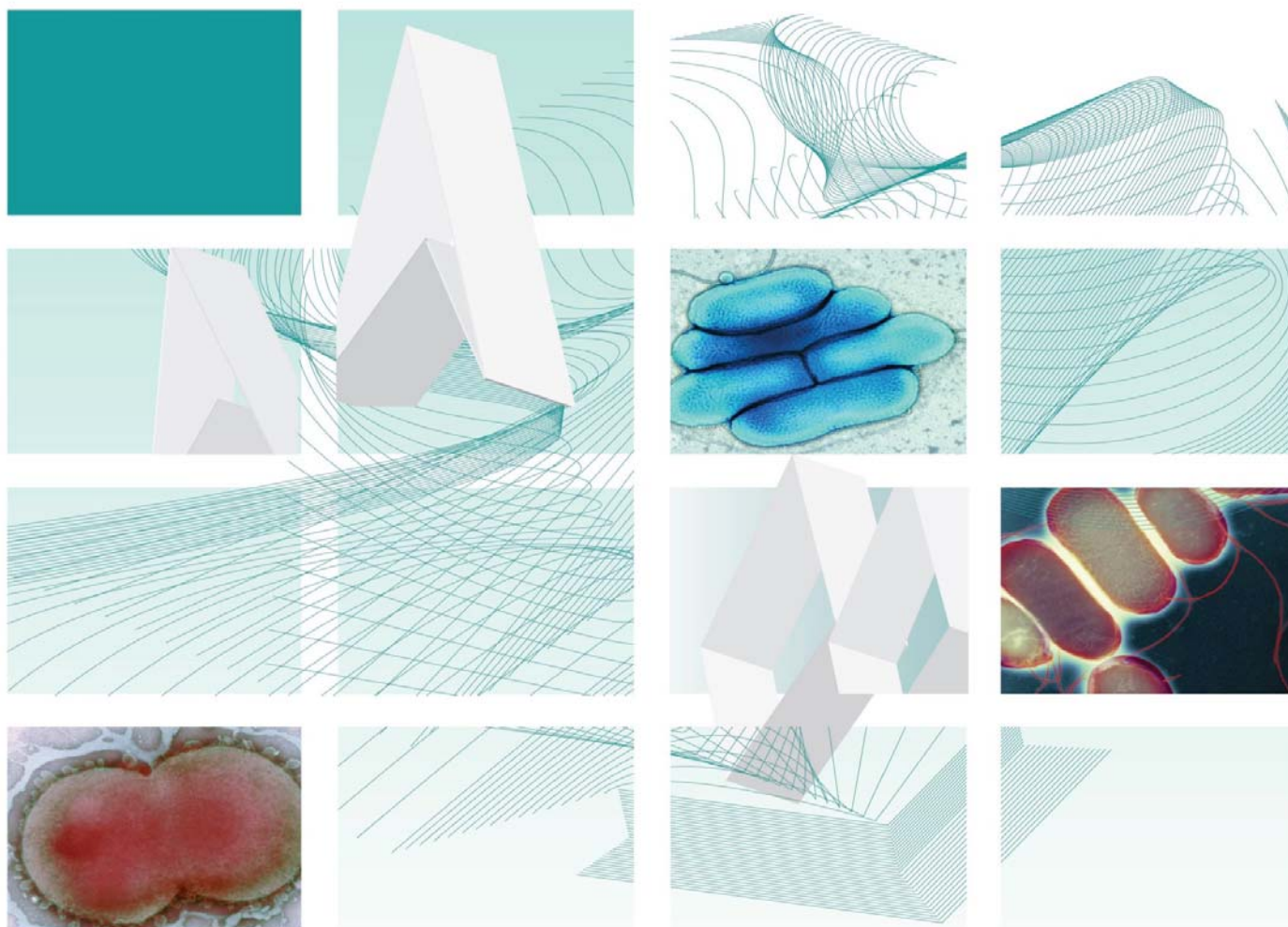




Protezione e miglioramento della salute pubblica nazionale

# Ricerche Microbiologiche: Procedure Standard del Regno Unito

## Identificazione di specie *Legionella*



Emesso da Standard Unit, Microbiology Services, PHE

Batteriologia – Identificazione | ID 18 | Emissione no: 3 | Data di emissione: 14.04.15 | Pagina: 1 di 21

## Ringraziamenti

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche (SMI - Standards for Microbiology Investigations) sono sviluppate sotto l'egida della Public Health England (PHE) in collaborazione con il Servizio Sanitario Nazionale (NHS - National Health Service), la Sanità Pubblica del Galles e con le organizzazioni professionali i cui loghi sono di seguito elencati sul sito web <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>. Le SMI sono sviluppate, revisionate e controllate da diversi gruppi di lavoro che sono supervisionati da un comitato direttivo (consultare <https://www.gov.uk/government/groups/standards-for-microbiology-investigations-steering-committee>).

Si ringraziano per contributi forniti i numerosi operatori dei laboratori clinici, gli specialisti e i laboratori di riferimento che hanno fornito informazioni e commenti durante lo sviluppo di questo documento. Si ringraziano i Revisori Medici per le modifiche apportate ai contenuti clinici.

Per ulteriori informazioni contattare:

Standards Unit  
Microbiology Services Division  
Public Health England  
61 Colindale Avenue  
London NW9 5EQ

E-mail: [standards@phe.org.uk](mailto:standards@phe.org.uk)

Website: <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

Numero pubblicazioni della PHE: 2015013

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche sono sviluppate con la collaborazione di:



I loghi sono aggiornati al momento della pubblicazione

## Contenuti

---

RINGRAZIAMENTI.....	2
CONTENUTI .....	3
TABELLA MODIFICHE .....	4
<b>RICERCHE MICROBIOLOGICHE STANDARD DEL REGNO UNITO: SCOPO E</b>	
<b>OBIETTIVO.....</b>	<b>6</b>
<b>SCOPO DEL DOCUMENTO .....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>9</b>
<b>INFORMAZIONE TECNICA/LIMITAZIONI.....</b>	<b>10</b>
<b>1    CONSIDERAZIONI SULLA SICUREZZA .....</b>	<b>11</b>
<b>2    MICROORGANISMI BERSAGLIO.....</b>	<b>11</b>
<b>3    IDENTIFICAZIONE .....</b>	<b>11</b>
<b>4    IDENTIFICAZIONE DI SPECIE <i>LEGIONELLA</i> .....</b>	<b>16</b>
<b>5    REFERTAZIONE .....</b>	<b>17</b>
<b>5    INVIO .....</b>	<b>17</b>
<b>9    NOTIFICA ALLA PHE O EQUIVALENTE.....</b>	<b>18</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>19</b>



NICE ha accreditato la procedura usata dalla Public Health England per elaborare gli Standards for Microbiology Investigations. L'accreditamento è valido per 5 anni dal Luglio 2011. Informazioni più dettagliate sull'accreditamento possono essere consultate: [www.nice.org.uk/accreditation](http://www.nice.org.uk/accreditation).

Per ulteriori informazioni sul nostro accreditamento consultare: : [www.nice.org.uk/accreditation](http://www.nice.org.uk/accreditation)

## Tabella delle Modifiche

Ciascun metodo SMI possiede una registrazione separata delle correzioni. Quelle attuali sono specificate in questa pagina. Le precedenti modifiche sono disponibili presso [standards@phe.gov.uk](mailto:standards@phe.gov.uk).

I documenti nuovi o revisionati devono essere controllati in ciascun laboratorio in accordo con il sistema locale di gestione della qualità.

Modifica No/Data.	5/14.04.15
Emissione eliminata. no	2.3
Emissione inserita no.	3
<b>Sezione(i) interessate</b>	<b>Modifica</b>
Intero documento	Collegamenti ipertestuali aggiornati al gov.uk.
Pagina 2.	Loghi aggiunti aggiornati.
Introduzione	La tassonomia delle specie di <i>Legionella</i> è stata aggiornata . Ulteriori informazioni sono state aggiunte alla sezione Caratteristiche. Sono menzionate le specie clinicamente rilevanti. Aggiornata la Sezione relativa ai Principi d'Identificazione per includere il MALDI-TOF
Informazione Tecnica/limitazioni	Aggiunte informazioni riguardanti i con L-cisteina, colorazione Gram e sierotipizzazione
Microrganismi Bersaglio	La sezione sui microrganismi bersaglio è stato aggiornata e presentata in modo chiaro.
Identificazione.	Aggiornamenti eseguiti in 3.2, 3.3 e 3.4 in relazione agli standard di procedura. Le Sezioni 3.4.3, 3.4.4 e 3.4.5 sono state aggiornate per includere sistemi commerciali di identificazione, MALDI - TOF MS e NAAT con relativa bibliografia. La sottosezione 3.5 è stata aggiornata per includere i Metodi Molecolari Rapidi.
Diagramma di flusso per Identificazione	Modifica del diagramma di flusso per identificazione delle specie di <i>Legionella</i> per facilitarne l'utilizzo.
Refertazione .	Le sottosezioni 5.3 e 5.5 sono state aggiornate in conformità alle informazioni richieste nella procedura di refertazione

Invio.	Aggiornati gli indirizzi dei laboratori di riferimento
Bibliografia	Bibliografia in parte aggiornata

# Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito<sup>#</sup>: Scopo e Obiettivo

---

## Utilizzatori delle SMI

- Nel Regno Unito le SMI sono principalmente destinate come risorsa generale ai professionisti che operano nel campo della medicina di laboratorio e delle malattie infettive.
- Le SMI forniscono ai clinici informazioni in merito allo standard dei servizi di laboratorio riferibili alle ricerche per la diagnosi delle infezioni nei loro pazienti e le documentazioni forniscono indicazioni che facilitano la prenotazione elettronica di tests appropriati.
- Le SMI forniscono gli standard per le ricerche microbiologiche anche ai responsabili della sanità pubblica che devono considerarle come parte delle procedure da adottare per la salute (sia clinica che pubblica) per la propria popolazione.

## Informazioni di Base per le SMI

Le SMI comprendono algoritmi e procedure raccomandate che riguardano tutte le componenti del processo diagnostico dalla fase pre-analitica (sindrome clinica) alle diverse fasi analitiche (prove di laboratorio) e post-analitiche (interpretazione e comunicazione dei risultati).

Gli algoritmi delle sindromi sono corredati da informazioni più dettagliate contenenti consigli sulle indagini per specifiche malattie e infezioni. Note orientative riguardano il contesto clinico, la diagnosi differenziale e indagini appropriate per particolari condizioni cliniche. Le note orientative descrivono metodologie di laboratorio essenziali che sono alla base della qualità, ad esempio la validazione.

La Standardizzazione del processo diagnostico conseguente all'adozione delle SMI consente di garantire in tutto il Regno Unito strategie d'indagine equivalenti nei diversi laboratori ed è una condizione essenziale per interventi nel campo della sanità pubblica, della sorveglianza e delle attività di sviluppo.

## Collaborazione Paritaria

La preparazione e stesura delle SMI è effettuata mediante collaborazione paritaria fra PHE, NHS, Royal College of Pathologists e le organizzazioni professionali.

L'elenco delle organizzazioni partecipanti può essere trovato su sito <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>.

L'inclusione del logo di una organizzazione in una SMI implica il sostegno degli obiettivi e del processo di preparazione del documento. I rappresentanti delle organizzazioni professionali fanno parte del comitato direttivo e dei Gruppi di Lavoro che sviluppano le SMI. Le opinioni dei rappresentanti possono non essere rigorosamente conformi a quelle dei membri delle organizzazioni a cui appartengono né a quelle delle loro organizzazioni. I rappresentanti prescelti rappresentano uno strumento bidirezionale per la consultazione e dialogo. Le opinioni espresse sono ricercate con un processo di consultazione.

Le SMI sono sviluppate, revisionate ed aggiornate con un ampio processo di consultazione

---

<sup>#</sup> Microbiologia è usato come termine generico per includere le due specialità di Microbiologia Medica riconosciute dal GMC (General Medical Council), (che comprende Batteriologia, Micologia e Parassitologia) e la Virologia Medica.

## Assicurazione di Qualità

Il NICE (National Institute for Health and Care Excellence) ha accreditato la procedura utilizzata dai Gruppi di Lavoro per produrre le SMI. L'accREDITAMENTO è applicabile a tutte le linee guida prodotte dall'Ottobre del 2009. La procedura per lo sviluppo delle SMI è certificata dalla ISO 9001:2008.

Le SMI rappresentano una procedura standard di buona qualità pratica alla quale si devono attenere per la propria attività tutti i laboratori di microbiologia clinica e di sanità pubblica del Regno Unito. Le SMI sono accreditate dal NICE e non rappresentano gli standard minimi di attività, e neppure il più alto livello di complesse indagini di laboratorio disponibili nel Regno Unito. Utilizzando le SMI, i laboratori dovranno tenere conto delle esigenze locali e intraprendere ricerche addizionali qualora opportune. Le SMI aiutano i laboratori a soddisfare i requisiti dell'accREDITAMENTO con la promozione di procedure d'elevata qualità che possono essere verificate. Le SMI forniscono inoltre un punto di riferimento per lo sviluppo del metodo.

Le prestazioni della SMI dipendono dal personale ben addestrato e dalla qualità dei reagenti e delle attrezzature utilizzate. I laboratori dovrebbero assicurare che tutti i reagenti di tipo commerciale e quelli messi a punto in laboratorio siano stati validati e risultati idonei allo scopo. I laboratori devono partecipare a programmi di valutazione di qualità esterni ed eseguire le relative procedure del controllo di qualità interno.

## Coinvolgimento del Paziente e della Comunità

Nello sviluppo delle SMI i rispettivi Gruppi di Lavoro sono impegnati per favorire il coinvolgimento dei pazienti e dell'opinione pubblica. Grazie al coinvolgimento pubblico, di operatori sanitari, ricercatori e organizzazioni di volontariato la SMI risultante sarà strutturalmente valida e atta a soddisfare le esigenze dell'utente. L'opportunità di partecipazione per contribuire alla consultazione è estesa al pubblico con l'accesso libero al nostro sito web

## Informazione della Gestione e dei Dati Sensibili

La PHE è un'organizzazione che condivide le direttive Caldicott. Ciò significa prendere ogni possibile precauzione per prevenire la diffusione non autorizzata di informazioni sui pazienti e di garantire che le informazioni relative agli stessi siano mantenute in condizioni di sicurezza.

Lo sviluppo di metodi SMI è soggetto agli obiettivi PHE di Uguaglianza

<https://www.gov.uk/government/organisations/public-health-england/about/equality-and-diversity>.

I Gruppi di Lavoro SMI sono impegnati a raggiungere gli obiettivi di parità di consultazione efficace con gli appartenenti al pubblico, i partner, le parti interessate ed i gruppi specialistici coinvolti.

## Dichiarazione Legale

Mentre ogni cura è stata intrapresa per la preparazione delle SMI, PHE e ogni altra organizzazione di sostegno, deve, per quanto possibile in base a qualunque legge vigente, escludere la responsabilità per tutte le perdite, costi, reclami, danni o spese derivanti da o connessi all'uso di una SMI o con qualsiasi informazione ivi contenuta. Se si apportano modifiche a una SMI, si deve porre in evidenza dove e da chi sono state effettuate tali modifiche.

Le conoscenze di base e la tassonomia microbica per la SMI sono le più complete possibili, al momento della pubblicazione. Eventuali omissioni e nuove informazioni saranno considerate nel corso della prossima revisione. Queste procedure standard (SMI) possono essere sostituite solo da revisioni dello standard, azione legislativa, o in seguito ad indicazioni da parte dell'ente accreditato NICE.

I diritti d'autore delle SMI sono della "Crown" e questi dovrebbero essere riconosciuti quando appropriato.

## Citazione Suggestita per questo Documento

Public Health England. (2015). Identification of *Legionella* species. UK Standards for Microbiology Investigations. ID 18 Emissione 3. <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>



## Scopo del Documento

---

Questa SMI descrive l'identificazione presunta a livello di specie di *Legionella* isolata da campioni clinici.

L'identificazione completa delle specie di *Legionella* non è conveniente per la maggior parte dei laboratori di routine di microbiologia clinica e gli isolati e dovrebbero essere inviati al Laboratorio di Riferimento

Questa SMI deve essere usata con le altre SMI

## Introduzione

---

### Tassonomia

La famiglia delle Legionellaceae include ora 52 specie ed oltre 70 sierogruppi<sup>1,2</sup>. Più del 90% degli isolati associati alla malattia dei Legionari sono di *Legionella pneumophila*, con l'84% appartenente a *L. pneumophila* sierogruppo 1 (sg1), quasi la metà delle specie di *Legionella* sono responsabili di malattia nell'uomo<sup>3</sup>. Sono note tre sottospecie e 16 sierogruppi di *L. pneumophila*, ma il sierogruppo 1 rappresenta la maggior parte degli isolati da infezioni nell'uomo<sup>4</sup>.

### Caratteristiche

La famiglia delle Legionellaceae è rappresentata da bastoncini pleiomorfi Gram negativi con colorazione debole. Nei tessuti o nelle secrezioni assumono generalmente forma cocco-bacillare, ma in coltura possono presentarsi con aspetto filamentoso. Sono aerobi, con particolari caratteristiche nutrizionali e non si sviluppano su agar sangue o agar carbone tamponato contenente estratto lievito privo di cisteina (BCYE - buffered charcoal yeast extract). La presenza di cisteina e ferro solubile nel terreno contribuisce a favorirne loro crescita<sup>2</sup>.

Gli appartenenti al genere sono di solito biochimicamente inerti, catalasi positivi (alcuni solo debolmente positivi) ossidasi-variabili e dotati di flagelli polari.

Alcune specie diverse da *L. pneumophila* diffondono fluorescenza di colore blu-bianco se esposte a luce UV (lunghezza d'onda di 360 nm $\pm$  20nm) mentre altre emettono fluorescenza di color giallo opaco o rosso mattone<sup>5</sup>.

**Specie di *Legionella* clinicamente importanti frequentemente isolate nelle infezioni umane;**

#### ***Legionella pneumophila***

Sono note tre sottospecie di *Legionella pneumophila* - *Legionella pneumophila* sottospecie *fraseri*, *Legionella pneumophila* sottospecie *pascullei* e *Legionella pneumophila* sottospecie *pneumophila*<sup>1,6</sup>.

Le cellule sono a forma di bastoncini Gram negativi, non acido resistenti, dimensioni di 0.3-0.9 $\mu$ m e 2-20 $\mu$ m o maggiori. Non sono dotate di capsula, non formano spore e sono aerobie. Sono mobili per uno o più flagelli dritti o ricurvi polari o laterali; talvolta alcuni ceppi non sono mobili. Sono ossidasi-variabili e catalasi positive. Producono beta-lattamasi ma non ureasi o riduzione dei nitrati. Sono attivamente positive per ippurato idrolasi. Sono chemoorganotrofe, utilizzando aminoacidi come fonti di carbonio e di energia. I carboidrati non sono fermentati né ossidati. Nei terreni contenenti tirosina formano un pigmento diffondente di colore marrone<sup>7</sup>.

La temperatura ottimale di crescita è 35-37 C. La crescita su terreni solidi è favorita dall'aumento dell'umidità. L'incubazione in 2-5% di CO<sub>2</sub> è in grado di favorire la crescita di

alcune Specie *Legionella*<sup>8</sup>. Su agar BCYE le colonie sono opalescenti, grigio-bianche con trama simile a cristallo. Per svilupparsi richiedono cisteina e ferro. Non crescono su agar sangue o altri terreni primari di uso comune. Non manifestano autofluorescenza blu-bianca o rossa.

E' stata isolata da espettorato, sangue, siero, lavaggio broncoalveolare, tessuto polmonare, cordone placentare umano così come da aria, acqua, fango, torri di raffreddamento industriali, ecc. E' l'agente eziologico principale della legionellosi<sup>6,8</sup>.

**Altre specie *Legionella* associate a malattie nell'uomo e segnalate nella sezione 2 del presente documento.**

### Principi di Identificazione

Le colonie di *Legionella* isolate su agar selettivo sono identificate per la loro morfologia, colorazione Gram e dall'esigenza di L-cisteina per la crescita.

L'identificazione molecolare completa utilizzando, ad esempio, MALDI-TOF MS può essere utile per identificare gli isolati di *Legionella* a livello di specie.

La tipizzazione e la differenziazione di *Legionella pneumophila* può essere ottenuta mediante diverse tecnologie molecolari, quali ad esempio Real-time Polymerase Chain reaction (PCR), Sequence based typing (SBT), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Whole Generation sequencing, ecc. Per maggiori informazioni, consultare la sezione 3.5 per identificazione ulteriore.

Tutti gli isolati da campioni clinici dovrebbero essere inviati al Laboratorio di Riferimento per la conferma e ulteriore identificazione.

## Informazioni Tecniche / Limiti

### Esigenza di L- cisteina

I laboratori dovrebbero essere consapevoli che alcuni ceppi di *L. oakridgensis* perdono l'esigenza di L-cisteina<sup>9</sup>.

### Colorazione di Gram

I ceppi di *Legionella* si colorano con difficoltà alla colorazione di Gram mentre risultano positivi all'impregnazione argentea o alla colorazione di Giemsa. La colorazione Gram dovrebbe essere allestita da coltura sviluppata su agar carbone estratto di lievito contenente ferro e cisteina<sup>7</sup>.

### Sierotipizzazione

L'utilizzo di antisieri per l'identificazione delle specie di *Legionella* è limitato dalla ridotta sensibilità e specificità; sono state ripetutamente segnalate reattività crociate fra sierogruppi, tra le varie specie del genere *Legionella*, e addirittura con altri generi pertanto lo "standard di riferimento" per la diagnosi di ogni forma di infezione da *Legionella* rimane l'isolamento in coltura<sup>10,11</sup>.

Per molte specie *Legionella* non sono commercialmente disponibili antisieri, particolarmente per le nuove specie<sup>7,8</sup>.

### Piastra Agar

BMPAα è consigliato per i campioni clinici, anche se alcune segnalazioni indicano il cefamandolo come inibitore di alcune specie *Legionella*<sup>8</sup>.

# 1 Considerazioni sulla Sicurezza<sup>12-28</sup>

Le specie *Legionella* appartengono al Gruppo di Rischio 2 anche se in alcuni casi la tipologia del lavoro con *L. pneumophila* impone condizioni di Contenimento di Livello 3.

Fare riferimento alle linee guida sulla sicurezza nella manipolazione di tutti i microrganismi presentate in questa SMI.

L'organismo si trasmette prevalentemente per via respiratoria.

Le procedure di laboratorio che generano aerosol infettivi devono essere eseguite in cabina microbiologica di sicurezza.

Le linee guida devono essere supplementate con il COSHH locale e con la valutazione del rischio.

E' essenziale il rispetto delle regolamentazioni postali e di trasporto.

## 2 Microrganismi bersaglio

### Specie *Legionella* Comunemente Considerate Causa di Infezioni nell'Uomo<sup>4,6</sup>

*Legionella pneumophila*

### Altre specie di *Legionella* considerate come Causa di Infezioni nell'Uomo<sup>1,29,30</sup>

*L. Anisa*, *L. birminghamensis*, *L. cardiac*, *L. cherrii*, *L. cincinnatiensis*, *L. feeleeii*, *L. gratiana*, *L. hackeliae*, *L. jordanis*, *L. lansingensis*, *L. longbeachae*, *L. lytica*, *L. nagasakiensis*, *L. oakridgensis*, *L. quinlivanii*, *L. sainthelensi*, *L. santicrucis*, *L. steelei*, *L. tucsonensis*, *L. wadsworthii*

## 3 Identificazione

### 3.1 Aspetto Microscopico

Colorazione di Gram (TP 39 - Staining Procedures)

Le cellule sono rappresentate da bastoncini Gram-negativi scarsamente/debolmente colorati, che possono essere filamentosi nelle colture più datate.

**Nota:** La colorazione di Gram deve essere preparata solo da agar contenenti cisteina.

### 3.2 Terreni di Isolamento Primario

1. Agar base Buffered-charcoal-yeast extract (BCYE) supplementato con ACES (N-2-acetammido-acido 2-aminetaneosolfuronico) tampone con L-cisteina incubato per un massimo di 10 giorni in ambiente umido a 35-37 ° C

<sup>e</sup>  
2. Agar selettivo; Tamponato cefamandolo, polimixina, anisomicina, terreno α-chetoglutarato (BMPAα) incubato per un massimo di 10 giorni in ambiente umido a 35-37°C.

**Nota:** L'incubazione con 2-5% di CO<sub>2</sub> è in grado di favorire la crescita di alcune specie *Legionella* quali *L. sainthelensi* e *L. oakridgensis*<sup>8</sup>. Questo basso livello di CO<sub>2</sub> non influenzerà la crescita di *L. pneumophila*, ma concentrazioni superiori al 5% di CO<sub>2</sub> possono inibirla.

### 3.3 Aspetto delle Colonie

Richiede l'uso di un microscopio binoculare a basso ingrandimento con luce incidente che illumina l'agar con un angolo d'incidenza acuto.

Le colonie di *Legionella* appaiono convesse, rotonde con centro simile a vetro smerigliato. Tuttavia, richiedono un minimo di 36 ore d'incubazione prima di poter essere visibili con un microscopio a ingrandimento ridotto. Una piastra letta a 24 ore fornirà informazioni su sede, numero e morfologia dei contaminanti. Questo controllo contribuirà a eliminare le colonie 'sospette' che potrebbero essere successivamente investigate se le piastre fossero lette solo in terza giornata. I margini delle colonie sono continui e tendono ad assumere bordi con aspetto verde maculato o viola rosato iridescente. Il colore delle colonie può variare da sfumature di viola o verde in un ambito di colori che dipendono dallo spessore della piastra di agar e dall'età della coltura (le colonie diventano grigie nel tempo).

### 3.4 Procedure di Prova

#### 3.4.1 Test biochimici

**Test della catalasi** ([TP 8 – Catalase Test](#)) Opzionale

Tutte le specie *Legionella* sono positive.

#### **Subculture di *Legionella* in agar selettivo e non selettivo.**

Le specie *Legionella* si sviluppano su *Legionella* agar base (BCYE) supplementato con tampone ACES, L-cisteina. Le specie sospette di *Legionella* non crescono sul medesimo terreno in assenza di L-cisteina. La crescita su entrambe le piastre indica che il microrganismo non appartiene alla specie *Legionella* (tranne alcuni ceppi di *L. oakridgensis* che non esige L-cisteina). Consultare Informazioni Tecniche.

Seminare ciascuna piastra di agar e per l'isolamento di colonie singole, diffondere l'inoculo con un'ansa sterile ([Q 5 - Inoculation of Culture Media for Bacteriology](#)).

Le colonie possono essere esaminate con raggi UV a onda lunga (360 nm $\pm$  20nm) per rivelare pigmentazione gialla su BCYE o autofluorescenza emessa dalle colonie di *Legionella*.

Dopo i rilievi sulla sottocultura, colorazione di Gram e catalasi, le culture a questo punto dovrebbero essere considerate come presunte positive fino alla conferma del Laboratorio di Riferimento.

#### 3.4.2 Sierotipizzazione

Le tecniche includono un test di screening di agglutinazione al lattice, esame con fluorescenza anticorpale indiretta (IFA), test immunoenzimatico (EIA)<sup>11</sup>. Si possono riscontrare, e sono state segnalate, reazioni crociate con *Campylobacter sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus sp* e altri batteri<sup>31</sup>.

#### 3.4.3 Sistemi Commerciali di Identificazione

I laboratori dovrebbero seguire le istruzioni del produttore; le prove rapide e le confezioni dovrebbero essere validate per dimostrare di essere idonee allo scopo prima dell'uso.

Utilizzare un sistema di commerciale (lattice o DFA- immunofluorescenza diretta) su un 'presunto' isolato per avere una identificazione di base, questa dovrebbe essere confermata dal Laboratorio di Riferimento.

### 3.4.4 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

Matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) che può essere utilizzato per analizzare la composizione proteica di una cellula batterica, è emerso come nuova tecnologia per l'identificazione di specie. Questo strumento ha dimostrato di essere potente e rapido per la sua riproducibilità, velocità e sensibilità analitica. Il vantaggio di MALDI-TOF rispetto ad altri metodi d'identificazione è la capacità di fornire risultati entro poche ore anziché diversi giorni. La velocità, la semplicità di preparazione del campione e l'acquisizione del risultato associato a costi minimi di consumo rendono questo metodo adatto per l'uso in routine e in centri ad alta produttività<sup>32</sup>

È stato utilizzato con successo per l'identificazione rapida e affidabile delle specie *Legionella*<sup>33</sup>. Consente di eseguire un'analisi completa da una sola colonia in pochi minuti, fornendo uno screening economico e rapido di un ampio numero di colonie in breve tempo. Il livello di accuratezza dipende in gran parte dal numero di spettri specie-specifici presenti nella banca dati e pertanto sarà utile la loro ulteriore espansione. Tuttavia, con questa tecnologia non sono ancora possibili l'identificazione e la classificazione dei ceppi nei diversi sierogruppi (in particolare di *L. pneumophila*)<sup>34</sup>.

### 3.4.5 Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs)

La Real-time PCR è definita anche polymerase chain reaction quantitativa (qPCR). La PCR è generalmente considerata un buon metodo di rilevazione batterica in quanto semplice, rapida, sensibile e specifica. La base per le applicazioni diagnostiche della PCR in microbiologia è la rivelazione di agenti infettivi e la discriminazione dei ceppi non patogeni da quelli patogeni in quanto dotati di geni specifici. Tuttavia, essa ha dei limiti. Sebbene il gene 16S rRNA funga generalmente da modello per la progettazione dei primer identificativi PCR specie-specifici, questo risulta difficile quando le sequenze dei geni omologhi hanno elevata affinità.

La PCR è stata utilizzata per la ricerca della *Legionella* nelle secrezioni respiratorie, urine e siero<sup>4,11,35</sup>. Possiede numerosi vantaggi nei confronti di altri metodi diagnostici essendo molto più veloce e sensibile con alcune ricerche che segnalano come questo metodo sia più sensibile dell'esame colturale<sup>11</sup>. I risultati della PCR possono essere disponibili in circa 4 ore dal ricevimento del campione e sono più facili da interpretare rispetto alla coltura che richiede maggior tempo (circa 8 giorni).

È stata pure sviluppata una PCR Multiplex utilizzata per rilevare e differenziare contemporaneamente specie di *Legionella*, *Legionella pneumophila*, e *Legionella pneumophila* sierogruppo 1. Questa può essere usata soprattutto in corso di focolai epidemici o a fini di sorveglianza. Non richiede l'isolamento in coltura e questo è un ulteriore vantaggio specialmente nei casi in cui gli antibiotici siano stati già somministrati e possono aver reso non vitale la *Legionella* ma potenzialmente è in grado di rilevare la presenza di acido nucleico<sup>3</sup>.

L'uso del test PCR associato agli altri metodi diagnostici descritti, può consentire una risposta più efficace nell'ambito della salute pubblica e un adeguato trattamento dei pazienti.

## 3.5 Identificazione Successiva

## Metodi Molecolari Rapidi

Sono stati sviluppati numerosi metodi molecolari per isolati da campioni clinici; questi includono tecniche molecolari quali la Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Multilocus Sequence Typing (MLST) e Whole Genome Sequencing (WGS). Tutti questi approcci consentono di sottotipizzare i ceppi non correlati, ma con diversa precisione, capacità discriminante, e riproducibilità.

I metodi molecolari hanno avuto un enorme impatto sulla tassonomia della *Legionella*. Le analisi della sequenze dei geni hanno aumentato la comprensione delle relazioni filogenetiche della *Legionella* e dei microrganismi correlati, determinando il riconoscimento di molte nuove specie. Le tecnologie-molecolari hanno reso l'identificazione di molte specie più rapide e precise di quanto sia stato possibile con le tecniche fenotipiche.

Tuttavia, alcuni di questi metodi rimangono disponibili solo per i laboratori di riferimento e sono difficili da implementare per l'identificazione batterica di routine nei laboratori clinici.

## Sequence Typing base

La nuova tecnologia molecolare, Sequence Based Typing (SBT), viene utilizzata dal CDC e dal gruppo di lavoro europeo per le infezioni da *Legionella* (EWGLI- European Working Group for Legionella Infection) per la sottotipizzazione della *L. pneumophila* sierogruppo 1. Altre specie di *Legionella* sono state identificate con questa tecnologia. L'EWGLI ha proposto l'uso della SBT come metodo standard per l'identificazione di epidemie conseguenti a viaggi correlati a focolai epidemici insorti nell'Unione Europea. Questo schema standard SBT EWGLI è stato recentemente ampliato per includere l'allele *neuA*, ed è stato anticipato che questo approccio non sarà di nuovo modificato. E' disponibile una banca dati su Internet (<http://www.ewgli.org>) che consente il recupero rapido di sequenze note di DNA di *Legionella pneumophila* depositate. Il sito web fornisce anche istruzioni dettagliate relative alla presentazione di nuovi alleli putativi, ad esempio la presentazione agli amministratori della banca dati, di sequenze di consenso associate a risultati di sequenziamento in direzione 5'-3' e 3'-5' (file cromatogramma)<sup>36,37</sup>.

Tuttavia, una limitazione per l'utilizzo del sequenziamento, risiede nel fatto che questo metodo richiede non solo una notevole quantità di tempo e di lavoro, ma è anche associato a costi relativamente onerosi.

## Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

La PFGE rileva la variazione genetica tra i ceppi utilizzando endonucleasi di restrizione per sequenze specifiche seguita da separazione dei grandi frammenti genomici ottenuti su gel di agarosio. La PFGE è nota per essere altamente discriminante, è una tecnica utilizzata frequentemente per indagini su focolai e ha acquisito una vasta applicazione nella caratterizzazione degli isolati epidemiologicamente correlati. Tuttavia, la stabilità della PFGE può essere insufficiente per l'applicazione in studi epidemiologici a lungo termine. Inoltre, a causa della sua natura (30 ore o più per l'esecuzione) e la richiesta di attrezzature speciali, la PFGE non è utilizzata se non nei laboratori di riferimento<sup>38,39</sup>

Questa tecnica è quella usata più frequentemente per identificare i ceppi dei sottotipi di *L. pneumophila* utilizzando *AscI* come enzima di restrizione. La PFGE con digestione *AscI* è in grado di tipizzare tutti i ceppi di *L. pneumophila* con elevata capacità di differenziazione e buona riproducibilità<sup>40</sup>.

## Whole Genome Sequencing (WGS)

Questo è noto anche come "sequenziamento completo del genoma, completo sequenziamento del genoma, o intero sequenziamento del genoma". Si tratta di un processo di laboratorio che determina la sequenza completa di DNA del genoma di un organismo in un'unica seduta. Sono

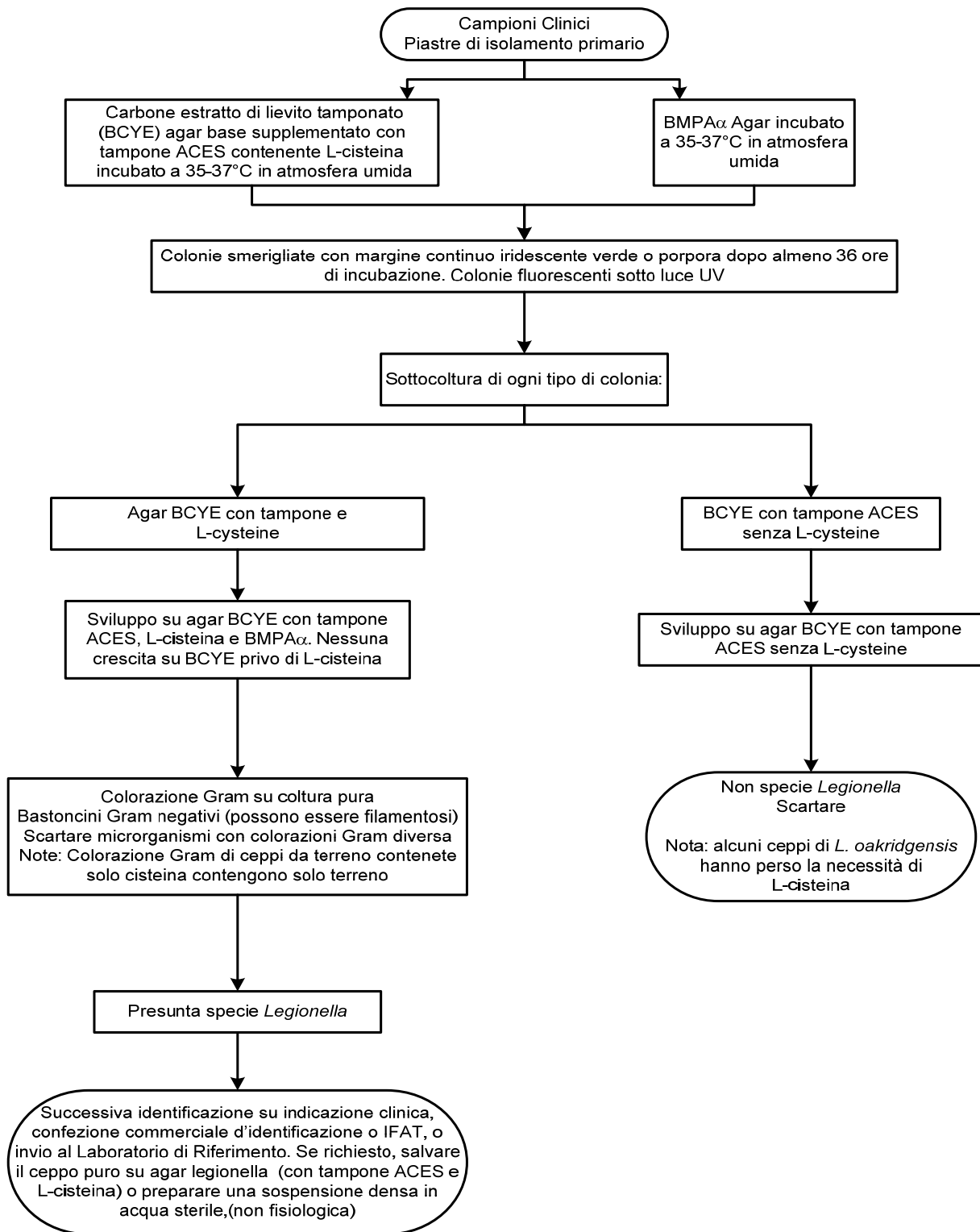
disponibili diverse tecniche ad alta produttività che sono disponibili ed utilizzate per sequenziare un intero genoma, come pyrosequencing, tecnologia nanopore, sequenziamento Illumina, sequenziamento Ion Torrent, ecc. Questo metodo di sequenziamento rappresenta una grande promessa per una rapida, precisa e completa identificazione delle vie di trasmissione batterica in ambito ospedaliero e istituzioni comunitarie, con concomitanti riduzione di infezioni, morbilità e costi.

Questo è stato utilizzato per differenziare gli isolati non epidemici da quelli riscontrati in corso di un'epidemia di malattia dei Legionari'. La principale limitazione è dovuta al numero limitato di genomi pubblicati per il confronto e saranno richieste altre ricerche per aumentare i profili genomici nelle banche dati di *L. pneumophila* isolate da fonti cliniche e ambientali<sup>41</sup>.

### 3.6 Conservazione e Invio

Conservare un isolato su terreno BCYE o come sospensione densa in acqua sterile o soluzione fisiologica di Page per l'invio al Laboratorio di Riferimento.

## 4 Identificazione di Specie *Legionella*:



Il diagramma di flusso è solo indicativo



## 5 Refertazione

---

### 5.1 Identificazione Presunta

Se rilevate appropriate caratteristiche di crescita, aspetto delle colonie, colorazione Gram.

### 5.2 Conferma dell'Identificazione

Dopo successive prove biomediche e/o metodi molecolari e/o invio al Laboratorio di Riferimento

### 5.3 Medico Microbiologo

Informare il medico microbiologo di tutte le specie isolate presunte *Legionella*.

Informare il medico microbiologo di tutte le specie isolate confermate *Legionella*.

Seguire i protocolli locali per la refertazione al clinico.

### 5.4 CCDC

Fare riferimento al Memorandum locale di Informazione.

### 5.5 Public Health England<sup>21</sup>

Fare riferimento alle linee guida attuali del CDSC ed alle indicazioni del COSURV.

Poiché la malattia dei Legionario nel RU è soggetta a denuncia, per la gestione della salute pubblica di casi, contatti ed epidemie, tutti i casi sospetti dovrebbero essere immediatamente notificati ai locali Public Health England Centres.

Tutti gli isolati clinicamente significativi dovrebbero essere notificati dai laboratori diagnostici per assicurare il rapido avvio di procedure corrette e tutti i ceppi isolati dovrebbero essere inviati al laboratorio nazionale di riferimento per la conferma.

### 5.6 Gruppo Prevenzione e Controllo Infezione

Informare il gruppo di controllo delle infezioni degli isolati nuovi o presunti di specie *Legionella*.

## 6 Invio

---

### 6.1 Laboratorio di Riferimento

Contattare l'appropriato laboratorio nazionale di riferimento per informazioni su accertamenti disponibili, tempi di risposta, procedure di trasporto ed altre informazioni riguardanti l'invio del campione:

Respiratory and Vaccine Preventable Bacteria Reference Unit  
Public Health England  
61 Colindale Avenue  
London  
NW9 5EQ

<https://www.gov.uk/rvpbru-reference-and-diagnostic-services>

Tel: 020 8327 7331 or 6906 or 7222

Contact PHE's main switchboard: Tel. +44 (0) 20 8200 4400

Inghilterra e Galles

<https://www.gov.uk/specialist-and-reference-microbiology-laboratory-tests-and-services>

## 7 Notifica al PHE<sup>42,43</sup> o Equivalente<sup>44-47</sup>

---

Le Norme di Denuncia del 2010 rendono obbligatorio ai laboratori diagnostici di denunciare alla Public Health England (PHE) tutti i casi nei quali s'identificano gli agenti causali elencati nella Scheda 2 della Direttiva. Le denunce devono pervenire per scritto, su carta o per via elettronica, entro sette giorni. I casi urgenti devono essere notificati il più presto possibile verbalmente: si raccomanda entro le 24 ore. Questi stessi devono essere in seguito denunciati in forma scritta entro sette giorni.

Secondo la Notification Regulations il laboratorio ricevente la notifica è l'ufficio locale della PHE. Se il caso è già stato notificato da un professionista medico abilitato, al laboratorio diagnostico è ancora richiesta la denuncia del caso qualora si riscontrino evidenze d'infezione imputabili ad agenti causali soggetti a tale disposizione.

La denuncia secondo la Direttiva dell'Health Protection (Notification) Regulations 2010 non sostituisce l'informazione volontaria alla PHE. La maggior parte dei laboratori del NHS segnala spontaneamente al PHE gran parte delle diagnosi di laboratorio sostenute da vari agenti eziologici e molte sezioni della PHE hanno definito accordi con i laboratori locali per segnalazioni urgenti di alcuni tipi d'infezione. Queste iniziative devono continuare.

**Nota:** La linea guida dell'Health Protection Legislation Guidance (2010) include la segnalazione per HIV & Sexually Transmitted Infections (STIs), Healthcare Associated Infections (HCAIs) and Creutzfeldt–Jakob disease (CJD) nel 'Notification Duties of Registered Medical Practitioners' STIs, HCAIs e CJD da includere nel 'Notification Duties of Registered Medical Practitioners', e non nel 'Notification Duties of Diagnostic Laboratories'.

<https://www.gov.uk/government/organisations/public-health-england/about/our-governance#health-protection-regulations-2010>

Esistono accordi diversi in [Scotland](#)<sup>44,45</sup>, [Wales](#)<sup>46</sup> and [Northern Ireland](#)<sup>47</sup>

## Bibliografia

---

1. Euzéby, JP. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature - Genus *Legionella*. 2013.
2. Bangsberg JM. Antigenic and genetic characterization of Legionella proteins: contributions to taxonomy, diagnosis and pathogenesis. APMIS Suppl 1997;70:1-53.
3. Benitez AJ, Winchell JM. Clinical Application of a Multiplex Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of Legionella Species, Legionella pneumophila, and Legionella pneumophila Serogroup 1. J Clin Microbiol 2013;51:348-51.
4. Stout JE, Yu VL. Legionellosis. N Engl J Med 1997;337:682-7.
5. Vickers RM, Yu VL. Clinical laboratory differentiation of Legionellaceae family members with pigment production and fluorescence on media supplemented with aromatic substrates. J Clin Microbiol 1984;19:583-7.
6. Brenner DJ, Steigerwalt AG, Epple P, Bibb WF, McKinney RM, Starnes RW, et al. Legionella pneumophila serogroup Lansing 3 isolated from a patient with fatal pneumonia, and descriptions of L. pneumophila subsp. pneumophila subsp. nov., L. pneumophila subsp. fraseri subsp. nov., and L. pneumophila subsp. pascullei subsp. nov. J Clin Microbiol 1988;26:1695-703.
7. MacFaddin JF. Gram- Negative Bacteria. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2000. p. 624-731.
8. Edelstein P. Legionella. In: Carroll K, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. Manual of Clinical Microbiology Volume 1. 10th ed. Washington, DC: ASM Press; 2011. p. 770-85.
9. Orrison LH, Cherry WB, Tyndall RL, Fliermans CB, Gough SB, Lambert MA, et al. Legionella oakridgensis: unusual new species isolated from cooling tower water. Appl Environ Microbiol 1983;45:536-45.
10. Roig J, Casal J. Is serological diagnosis of Legionnaires' disease a reliable method? Diagn Microbiol Infect Dis 2002;43:171-2.
11. Lindsay DS, Abraham WH, Findlay W, Christie P, Johnston F, Edwards GF. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to Legionella pneumophila serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. J Med Microbiol 2004;53:183-7.
12. European Parliament. UK Standards for Microbiology Investigations (SMIs) use the term "CE marked leak proof container" to describe containers bearing the CE marking used for the collection and transport of clinical specimens. The requirements for specimen containers are given in the EU in vitro Diagnostic Medical Devices Directive (98/79/EC Annex 1 B 2.1) which states: "The design must allow easy handling and, where necessary, reduce as far as possible contamination of, and leakage from, the device during use and, in the case of specimen receptacles, the risk of contamination of the specimen. The manufacturing processes must be appropriate for these purposes".
13. Official Journal of the European Communities. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on *in vitro* diagnostic medical devices. 7-12-1998. p. 1-37.
14. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.
15. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
16. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.

17. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).
18. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32
19. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.
20. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.
21. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological Agents: Managing the Risks in Laboratories and Healthcare Premises. Appendix 1.2 Transport of Infectious Substances - Revision. Health and Safety Executive. 2008.
22. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories. MMWR Surveill Summ 2012;61:1-102.
23. Health and Safety Executive. Control of Substances Hazardous to Health Regulations. The Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002. 5th ed. HSE Books; 2002.
24. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
25. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
26. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.
27. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.
28. British Standards Institution (BSI). BS 5726:2005 - Microbiological safety cabinets. Information to be supplied by the purchaser and to the vendor and to the installer, and siting and use of cabinets. Recommendations and guidance. 24-3-2005. p. 1-14
29. Tang PW, Toma S, MacMillan LG. Legionella oakridgensis: laboratory diagnosis of a human infection. J Clin Microbiol 1985;21:462-3.
30. Vinh DC, Garceau R, Martinez G, Wiebe D, Burdz T, Reimer A, et al. Legionella jordanis lower respiratory tract infection: case report and review. J Clin Microbiol 2007;45:2321-3.
31. Maiwald M, Helbig JH, Luck PC. Laboratory methods for the diagnosis of Legionella infections. Journal of Microbiological Methods 1998;33:59-79.
32. Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E, et al. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Appl Environ Microbiol 2008;74:5402-7.
33. Gaia V, Casati S, Tonolla M. Rapid identification of Legionella spp. by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting. Syst Appl Microbiol 2011;34:40-4.
34. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. Clin Microbiol Rev 2013;26:547-603.
35. Rantakokko-Jalava K, Jalava J. Development of conventional and real-time PCR assays for detection of Legionella DNA in respiratory specimens. J Clin Microbiol 2001;39:2904-10.

36. Gaia V, Fry NK, Afshar B, Luck PC, Meugnier H, Etienne J, et al. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 2005;43:2047-52.
37. Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, Luck PC. Addition of neuA, the gene encoding N-acylneuraminate cytidyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol* 2007;45:1965-8.
38. Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol* 2006;55:645-59.
39. Brosch R, Brett M, Catimel B, Luchansky JB, Ojeniyi B, Rocourt J. Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of *Listeria monocytogenes* via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Int J Food Microbiol* 1996;32:343-55.
40. Zhou H, Ren H, Zhu B, Kan B, Xu J, Shao Z. Optimization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for *Legionella pneumophila* Subtyping. *Appl Environ Microbiol* 2010;76:1334-40.
41. Reuter S, Harrison TG, Koser CU, Ellington MJ, Smith GP, Parkhill J, et al. A pilot study of rapid whole-genome sequencing for the investigation of a *Legionella* outbreak. *BMJ Open* 2013;3.
42. Public Health England. Laboratory Reporting to Public Health England: A Guide for Diagnostic Laboratories. 2013. p. 1-37.
43. Department of Health. Health Protection Legislation (England) Guidance. 2010. p. 1-112.
44. Scottish Government. Public Health (Scotland) Act. 2008 (as amended).
45. Scottish Government. Public Health etc. (Scotland) Act 2008. Implementation of Part 2: Notifiable Diseases, Organisms and Health Risk States. 2009.
46. The Welsh Assembly Government. Health Protection Legislation (Wales) Guidance. 2010.
47. Home Office. Public Health Act (Northern Ireland) 1967 Chapter 36. 1967 (as amended).