 <p>ASP MESSINA</p>	<p>DIPARTIMENTO DELLA PREVENZIONE</p> <p>LABORATORIO DI SANITÀ AZIENDA SANITARIA PROVINCIALE</p> <p>PUBB</p> <p>LICA</p>	<p>Procedura Operativa Standard Ricerca di <i>Legionella pneumophila</i> in matrici ambientali</p>	
Sigla di identificazione 08 -PO-leg	Rev n.3	Data: 02/02/18	Pag. 1 di 8


INDICE

PUNTO	TITOLO	PAG
1	SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	2
2	DOCUMENTI DI RIFERIMENTO	2
3	DEFINIZIONI	2
4	ABBREVIAZIONI	2
5	RESPONSABILITÀ	2
6	DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ	3
6.1	Ricevimento e verifica di idoneità dei campioni	3
6.2	Esecuzione degli esami secondo i metodi di prova	4
6.3	Valutazione della compatibilità dei risultati	6
6.4	Calcolo del valore medio ed espressione dei risultati	6
6.5	Calcolo dell' intervallo di fiducia	7
6.6	Espressione dei risultati	7
6.7	Trasmissione dei risultati e archiviazione della documentazione	7
6.8	Flusso informativo	8

--	--

Copia controllata o non controllata n. _____			Consegnata a: _____		
Rev.	Descrizione	Data	Preparazione	Verifica	Approvazione

Sigla di identificazione: 08- PO-leg	Data: 02/02/18	Rev.:03	Pag 1/8
Preparato da: dott. Ersilia Savicelli	Verificato da: dott. Angelo Vasi	Approvato da: dott. G.R. Trimarchi	

	<p>DIPARTIMENTO DELLA PREVENZIONE</p> <p>LABORATORIO DI SANITÀ</p> <p>AZIENDA SANITARIA PROVINCIALE</p> <p>PUBB</p> <p>LICA</p>	<p>Procedura Operativa Standard</p> <p>Ricerca di <i>Legionella pneumophila</i> in matrici ambientali</p>	
Sigla di identificazione 08 -PO-leg	Rev n.3	Data: 02/02/18	Pag. 2 di 8

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Identificazione del germe *Legionella pneumophila* mediante l' utilizzo di appropriati metodi di prova al fine di controllare le fonti di infezione e valutare il rischio di esposizione nell'ambito di indagine epidemiologica e/o di sorveglianza e prevenzione. Inoltre descrive la modalità di preparazione del rapporto di prova, della trasmissione dei risultati al cliente e dell'archiviazione di tutti i documenti ad essi correlati.

2. DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

PG-01:emissione dei documenti del sistema qualità;
 PG-05:gestione del reagentario e materiali di riferimento;
 PG-06:gestione delle non conformità;
 PG-08:accettazione e gestione dei campioni da sottoporre a prova;
 PG-09:gestione e manutenzione delle apparecchiature di misura e prova;
 PG-12:formazione addestramento ed aggiornamento del personale;
 Allegato 3, Allegato 4 e Allegato 5 delle “**Linee-guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi versione 2015.**”
 Metodica UNI EN ISO 11731 – 2° edizione - 2017-05

3. DEFINIZIONI

Legionella: batterio gram-, asporigeno, aerobio obbligato, non fermentante gli zuccheri, bastoncellare, che può presentare pleiomorfismo soprattutto in coltura, mobile, catalasi +, capace di crescere in non meno di 2 giorni su agar tamponato contenente carbone, estratto di lievito, L-cisteina e ferro, formando colonie in genere bianche o grigie.

Conta delle colonie: numero delle colonie contate su una piastra Petri contenente terreno agarizzato.


Conteggio: risultato finale in termini di Unità Formanti Colonie (UFC) per litro di campione.

Diluizione: sospensione ottenuta miscelando un volume misurato della sospensione madre con un volume del diluente pari a n volte il volume suddetto.

4. ABBREVIAZIONI

MdQ: Manuale della qualità

Sigla di identificazione: 08- PO-leg	Data: 02/02/18	Rev.:03	Pag 2/8
Preparato da: dott. Ersilia Savicelli	Verificato da: dott. Angelo Vasi	Approvato da: dott. G.R. Trimarchi	

	DIPARTIMENTO DELLA PREVENZIONE LABORATORIO DI SANITÀ AZIENDA SANITARIA PROVINCIALE PUBB LICA	Procedura Operativa Standard Ricerca di <i>Legionella pneumophila</i> in matrici ambientali	
Sigla di identificazione 08 -PO-leg	Rev n.3	Data: 02/02/18	Pag. 3 di 8

PG: Procedura gestionale
POS: Procedura operativa standard
AL : Allegato
RGAC: Registro Generale Accettazione Campioni
DL: Direttore
RS: responsabile di sezione

5. RESPONSABILITÀ

RS dipende direttamente da DL ha la responsabilità delle operazioni tecniche e coordina le attività svolte nella sezione in collaborazione con gli operatori tecnici assegnati alla sezione.

In particolare:

- esegue le analisi verificando la corretta applicazione delle metodiche;
- effettua tutti i calcoli sui risultati analitici ovvero verifica i calcoli effettuati da altri operatori e valida il dato analitico;
- propone miglioramenti del SQ e contribuisce al suo sviluppo; collabora con il RQ nella stesura delle istruzioni tecniche della propria Sezione;
- assicura l'implementazione delle Azioni Correttive proposte;
- trasmette al RS competente le richieste di approvvigionamento di materiali di consumo e reagenti;
- esamina la conformità dei prodotti forniti e comunica le eventuali non conformità al RS competente;**
- garantisce la conservazione corretta dei reagenti e del materiale di riferimento;
- propone a DL e RS competente l'acquisizione di nuovi reagenti, materiali di consumo e materiali di riferimento, predisponendo prove di valutazione e verifica di qualità;
- raccoglie tutte le schede tecniche e di sicurezza dei reagenti e materiali di riferimento in uso nella Sezione;
- collabora con RQ ed DL per la gestione dei Reclami.


6. DESCRIZIONE DELLE ATTIVITÀ

Procedura implementata dal laboratorio per l'accettazione del materiale da saggio, per l'esecuzione del metodo di prova per la ricerca di *L. pneumophila* in matrici ambientali, per la tenuta sotto controllo del dato analitico, per la preparazione del rapporto di prova e trasmissione dei risultati al richiedente ed infine all'archiviazione di tutti i documenti generati.

6.1 RICEVIMENTO E VERIFICA DI IDONEITÀ

I campioni ambientali devono giungere al Laboratorio trasportati al buio, a temperatura ambiente, avendo cura di separare i campioni di acqua calda da quelli di acqua fredda e preservando questi

Sigla di identificazione: 08- PO-leg	Data: 02/02/18	Rev.:03	Pag 3/8
Preparato da: dott. Ersilia Savicelli	Verificato da: dott. Angelo Vasi	Approvato da: dott. G.R. Trimarchi	

	DIPARTIMENTO DELLA PREVENZIONE LABORATORIO DI SANITÀ AZIENDA SANITARIA PROVINCIALE PUBB LICA	Procedura Operativa Standard Ricerca di <i>Legionella pneumophila</i> in matrici ambientali	
Sigla di identificazione 08 -PO-leg	Rev n.3	Data: 02/02/18	Pag. 4 di 8

ultimi da temperature stagionali elevate evitando, comunque, temperature di refrigerazione inferiori a +2°.

Il rilevamento di temperature non conformi, tali da richiedere l'annullamento delle prove, deve essere registrato sul “verbale di prelievo” e deve esserne fatta comunicazione al servizio che ha predisposto il campionamento.

Nel caso di non idoneità del campione, questo viene riconsegnato, dopo aver compilato l'apposito modulo di non idoneità (AL 08-04)

I campioni ritenuti idonei sono registrati sul RGAC con un numero ordinario progressivo; lo stesso numero viene riportato sul campione con grafica indelebile.

A fine registrazione viene emesso il foglio di lavoro (08-PO-leg/AL01), che, unitamente al campione e al verbale di prelievo viene portato in laboratorio dall'addetto all'accettazione, che lo consegna esclusivamente al personale addetto all'esecuzione dell'analisi.

Il verbale di prelievo e il foglio di lavoro sono quindi inseriti all'interno di apposito raccoglitore recante sul frontespizio i dati identificativi del campione e custoditi in laboratorio.

6.2 ESECUZIONE DEGLI ESAMI SECONDO I METODI DI PROVA

L'esecuzione delle analisi è affidato al personale adeguatamente formato ed addestrato secondo quanto stabilito dalla PG-12.

I campioni vengono analizzati entro 24 ore dal campionamento; in caso di tempi più lunghi, vengono conservati nel frigorifero (n°2bis) avente la dicitura “MATERIALE DA SAGGIO DA SOTTOPORRE A PROVA” alla temperatura di +4 °C (range accettabile +2 °C/ +8 °C) per un massimo di 7 gg.

Le rimanenti parti del campione non sottoposte a prova vengono conservate nel frigorifero (n°29) avente la dicitura “MATERIALE DA SAGGIO IN CORSO DI PROVA” alla temperatura di +4°C (range accettabile +2 °C / +8 °C)

L'esecuzione della prova viene effettuata applicando la Metodica UNI EN ISO 11731 – 2° edizione - 2017-05

PROTOCOLLO ANALITICO

Metodica UNI EN ISO 11731 – 2° edizione - 2017-05

6.2.1. Concentrazione per filtrazione

Sigla di identificazione: 08- PO-leg	Data: 02/02/18	Rev.:03	Pag 4/8
Preparato da: dott. Ersilia Savicelli	Verificato da: dott. Angelo Vasi	Approvato da: dott. G.R. Trimarchi	

	<p>DIPARTIMENTO DELLA PREVENZIONE</p> <p>LABORATORIO DI SANITÀ</p> <p>AZIENDA SANITARIA PROVINCIALE</p> <p>PUBB</p> <p>LICA</p>	<p>Procedura Operativa Standard</p> <p>Ricerca di <i>Legionella pneumophila</i> in matrici ambientali</p>	
Sigla di identificazione 08 -PO-leg	Rev n.3	Data: 02/02/18	Pag. 5 di 8

1. Agitare bene il campione d'acqua
2. Concentrare mediante filtrazione con membrane sterili di policarbonato con porosità μm 0,2.
3. Utilizzando pinzette sterili prelevare la membrana e porla in contenitore sterile con tappo a vite contenente mL 10 della stessa acqua e procedere al distacco dei microrganismi trattenuti sulla membrana attraverso un'azione meccanica.
4. Agitare su vortex e/o su agitatore meccanico per 20'.
5. Trattare parte della sospensione a 50 °C per 30'.
6. Piastrare mL 0,1 dei **campioni trattati e non trattati** su 2 piastre di **BCYE agar Growth Supplement** e 2 piastre di **BCYE agar Growth Supplement con MWY o GVPC**.
7. Conservare il campione concentrato nel frigorifero **(n°29)** avente la dicitura "MATERIALE DA SAGGIO IN CORSO DI PROVA" alla temperatura di +4 °C (range accettabile +2 °C/ +8 °C).
8. Incubare le piastre a 36-37 °C in aerobiosi in incubatore con 2,5% di CO₂.
9. Esaminare giornalmente le piastre.
10. Nel caso di **eccessiva crescita**, dopo 24-48 h, effettuare **diluizioni** 1:10 e 1:100 con **Acqua distillata sterile** del campione concentrato conservato a +4 °C, ripetendo la procedura a partire dal punto 5.
11. Eliminare una piastra come NEGATIVA a partire da 10 gg. di incubazione.
12. Le colonie di Legionella compaiono dopo 4-10 gg di incubazione si presentano piccole, di colore bianco-grigio, lucenti, diametro di mm 1-2, bombate con margine intero.

6.2.2. Procedimento per campioni ambientali a matrice non acquosa


Depositi e sedimenti

Effettuare diluizioni 1:10, 1:100 con acqua distillata sterile o soluzione Ringer, agitare bene, trattare la sospensione al calore e procedere come descritto per le matrici acquose.

Incrostazioni

Frantumare e tritare le incrostazioni in mortaio o mixer sterili. Trattare la sospensione al calore e procedere come descritto per le matrici acquose.

Sigla di identificazione: 08- PO-leg	Data: 02/02/18	Rev.:03	Pag 5/8
Preparato da: dott. Ersilia Savicelli	Verificato da: dott. Angelo Vasi	Approvato da: dott. G.R. Trimarchi	

	DIPARTIMENTO DELLA PREVENZIONE LABORATORIO DI SANITÀ AZIENDA SANITARIA PROVINCIALE PUBB LICA	Procedura Operativa Standard Ricerca di <i>Legionella pneumophila</i> in matrici ambientali	
Sigla di identificazione 08 -PO-leg	Rev n.3	Data: 02/02/18	Pag. 6 di 8

Tamponi

Agitare il tampone nella provetta per risospendere il materiale raccolto e procedere come descritto per le matrici acquose.

Filtri

Lavare il filtro in un volume minimo di acqua distillata sterile o in soluzione di Ringer. Per volumi maggiori di 20 mL effettuare una centrifugazione a 3000 giri per 30 minuti tra 15 e 25 °C. Eliminare il surnatante mediante pipetta sterile e risospendere il deposito in 2-20 mL di soluzione Ringer. Trattare la sospensione al calore e procedere come descritto per le matrici acquose.

Aria

Per il prelievo viene utilizzato il metodo di impatto su agar. Le piastre vengono incubate in incubatore a CO₂ procedendo come descritto per le matrici acquose.

PROVA DIFFERENZIALE PRELIMINARE

Nel caso di presenza di colonie tipiche effettuare subcolture di almeno 5 colonie sospette su **BCYE agar Growth Supplement** e su **BCYE agar -Cys Growth Supplement**;

Prendere in considerazione, fra tutte le piastre seminate quelle che alla diluizione più bassa presenta un numero di colonie non superiore a 150.

Incubare a 37 °C per 48 h in incubatore a CO₂.

Per crescita di colonie inferiore a 5, piastrare tutte le colonie sviluppatesi.

Le colonie di Legionella presenteranno crescita su terreno **BCYE agar Growth Supplement** e non presenteranno crescita sul terreno **BCYE agar-Cys Growth Supplement**.

La crescita su ambedue i terreni esclude la presenza della Legionella.


IDENTIFICAZIONE DEFINITIVA

Saggiare le colonie sospette con antisieri specifici anti-*Legionella pneumophila* sierogruppo 1, anti-*Legionella pneumophila* sierogruppo 2-15 e anti-*Legionella* spp.

6.3 VALUTAZIONE DELLA COMPATIBILITÀ DEI RISULTATI

La seguente procedura ha lo scopo di valutare la compatibilità dei conteggi ottenuti da due prove condotte in

Sigla di identificazione: 08 - PO-leg	Data: 02/02/18	Rev.:03	Pag 6/8
Preparato da: dott. Ersilia Savicelli	Verificato da: dott. Angelo Vasi	Approvato da: dott. G.R. Trimarchi	

	DIPARTIMENTO DELLA PREVENZIONE LABORATORIO DI SANITÀ AZIENDA SANITARIA PROVINCIALE PUBB LICA	Procedura Operativa Standard Ricerca di <i>Legionella pneumophila</i> in matrici ambientali	
Sigla di identificazione 08 -PO-leg	Rev n.3	Data: 02/02/18	Pag. 7 di 8

parallelo

Per stimare la **ripetibilità di 2 prove in parallelo** (2 piastre per ogni diluizione) si applica la seguente formula:

$$K_p = |C_1 - C_2| : \sqrt{(C_1 + C_2)} \quad \text{dove } K_p = \text{fattore di copertura} \quad C_1 \text{ e } C_2 = \text{conte}$$

Criteri di valutazione del fattore di copertura K_p :

- se $K_p \leq 2$ il risultato è accettabile;
- se K_p è compreso tra 2 e 2,6 verificare il conteggio della diluizione successiva, la dispersione è considerata critica;
- se K_p è superiore a 2,6 il risultato non è accettabile.

6.4 CALCOLO DEL VALORE MEDIO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Per determinare il numero UFC di Legionella presenti nel campione, si devono considerare le piastre che presentano il maggior numero di colonie confermate.

Quando si eseguono due prove in parallelo, per il conteggio si applica la seguente formula:

$$C_m = [(C_1 + C_2) : 2] \times 10^2 \times n$$

Dove $C_1 + C_2$ = somma delle colonie contate nelle piastre
 n = fattore di diluizione

Poiché la metodica prevede la conferma delle colonie sospette, il C_m deve essere calcolato tenendo conto di

$$C_m = b/A \times C \quad \text{dove} \quad \begin{array}{l} b = \text{numero di colonie confermate} \\ A = \text{numero di colonie presunte positive sottoposte a conferma} \\ C = \text{numero totale di colonie presunte positive per la caratteristica considerata} \end{array}$$

6.5 CALCOLO DELL' INTERVALLO DI FIDUCIA (AD UN LIVELLO DI PROBABILITÀ DEL 95%)

Non applicabile.

6.6 ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Sigla di identificazione: 08- PO-leg	Data: 02/02/18	Rev.:03	Pag 7/8
Preparato da: dott. Ersilia Savicelli	Verificato da: dott. Angelo Vasi	Approvato da: dott. G.R. Trimarchi	

	DIPARTIMENTO DELLA PREVENZIONE LABORATORIO DI SANITÀ AZIENDA SANITARIA PROVINCIALE PUBB LICA	Procedura Operativa Standard Ricerca di <i>Legionella pneumophila</i> in matrici ambientali	
Sigla di identificazione 08 -PO-leg	Rev n.3	Data: 02/02/18	Pag. 8 di 8

I dati riportati sul rapporto di prova sono espressi da un numero compreso tra 1,0 e 9,9 moltiplicato per la potenza appropriata di 10 o con un numero intero con 2 cifre significative, tenendo conto delle regole di arrotondamento (se la terza cifra è ≥ 5 , quella precedente deve essere aumentata di una unità; se la terza cifra è < 5 , quella precedente resta invariata).

Per i campioni ambientali a matrice non acquosa, l'espressione dei risultati sarà qualitativa e verrà espressa come presenza/assenza nella matrice esaminata.

6.7 TRASMISSIONE DEI RISULTATI E ARCHIVIAZIONE DELLA DOCUMENTAZIONE

Al termine delle procedure analitiche, RS o il Dirigente che ha condotto l'analisi trascrive l'esito sul Registro Ufficiale, compila il rapporto di prova e la lettera di accompagnamento, appone la sua firma sul RdP, che viene inserito nel fascicolo pertinente predisposto al momento dell'accettazione. Successivamente, lo sottopone a DL, che appone la sua firma sul RdP e sulla lettera di accompagnamento. L'addetto della segreteria cura l'iscrizione sul registro d'uscita e la trasmissione a mezzo posta elettronica in formato PDF.

Il fascicolo contenente il verbale di prelievo, i fogli di lavoro numerati progressivamente, la copia del RdP, della lettera di accompagnamento e l'attestato dell'avvenuta notifica al cliente/utente, è archiviato all'interno di un carpettone dedicato, posto nell'armadio metallico della segreteria.

6.8 FLUSSO INFORMATIVO

Controllo preventivo

Le analisi vengono inviate a

Al Direttore del Dipartimento della Prevenzione
ASP 5 Messina

Al Responsabile del SIAV
ASP 5 Messina

ed in caso il prelievo sia stato effettuato in Provincia

Al Responsabile della U.O.S. Medicina preventiva
Dipartimento della Prevenzione
Area territoriale di
Taormina

Sigla di identificazione: 08- PO-leg	Data: 02/02/18	Rev.:03	Pag 8/8
Preparato da: dott. Ersilia Savicelli	Verificato da: dott. Angelo Vasi	Approvato da: dott. G.R. Trimarchi	

 <p>ASP MESSINA</p>	<p>DIPARTIMENTO DELLA PREVENZIONE</p> <p>LABORATORIO DI SANITÀ AZIENDA SANITARIA PROVINCIALE</p> <p>PUBB</p> <p>LICA</p>	<p>Procedura Operativa Standard Ricerca di <i>Legionella pneumophila</i> in matrici ambientali</p>	
Sigla di identificazione 08 -PO-leg	Rev n.3	Data: 02/02/18	Pag. 9 di 8

Milazzo
Barcellona
Lipari
Patti
S.Agata M.
Mistretta

Controllo in corso di indagine epidemiologica

Le analisi vengono inviate a Al Direttore del Servizio di Sanità Pubblica,
Epidemiologia e Medicina preventiva
ASP 5 Messina

Controllo su richiesta di utenti/clienti

Le analisi vengono inviate per posta esclusivamente al richiedente

7. DOCUMENTI GENERATI

modulo di non idoneità

08-PO-leg/AL01 Foglio di lavoro

08 -PO-01leg.03/AL01 Rapporto di Prova

Sigla di identificazione: 08- PO-leg	Data: 02/02/18	Rev.:03	Pag 9/8
Preparato da: dott. Ersilia Savicelli	Verificato da: dott. Angelo Vasi	Approvato da: dott. G.R. Trimarchi	