

Δειγματοληψία δειγμάτων νερών για ανίχνευση *Legionella* spp.

Δρ Αναστασία Σ. Φλούντζη
Ιατρός Βιοπαθολόγος – Μικροβιολόγος

Κέντρο Αναφοράς Λεγεωνέλλας Νοτίου Ελλάδος /
Κεντρικό Εργαστήριο Δημόσιας Υγείας – ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.
Βάρη-Αττική

Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά *Legionella* spp.

- **Παρασιτικό** βακτηρίδιο αφού πολλαπλασιάζεται στο εσωτερικό πρωτοζώων (αμοιβάδων κ.ά.) αλλά και ανθρώπινων φαγοκυττάρων
- Κατά **Gram αρνητικός** βάκιλλος, με σύνθετες θρεπτικές ανάγκες όπως η ανάγκη του για **σίδηρο** και **κυστεΐνη**

Legionella spp.

- Αν και περίπου **50** είδη έχουν περιγραφεί, μόνον ορισμένα (**28** περίπου) έχουν συσχετισθεί με τη νόσο στον άνθρωπο
- Από αυτά, συχνότερα ανευρισκόμενη είναι η ***Legionella pneumophila*** (**90 %**) σε διαγνωσμένα περιστατικά με τη νόσο, ενώ ο ορότυπος **1** ευθύνεται για το **82 %** των περιστατικών
- Ακολουθούν σε συχνότητα εμπλοκής σε νόσο οι
 - ***Legionella micdadei***
 -
 - ***Legionella longbeachae***
 - ***Legionella bozemanii***
- Στα νοσοκομεία και Χ.Π.Υ.Υ. ένα **20 %** των περιστατικών μολύνονται και πάσχουν από στελέχη μη ***Legionella pneumophila*** οροτύπου **1**

Legionella spp.

- Η *Legionella pneumophila* περιλαμβάνει **15** περίπου **διακριτές οροομάδες με υποτύπους**
- Η *Legionella pneumophila* ευθύνεται για το **80%-90%** των λοιμώξεων στον άνθρωπο
- Η *Legionella pneumophila* οροομάδας 1 είναι η **συχνότερα ταυτοποιούμενη** μορφή του βακτηρίου από ασθενείς και ακολουθούν οι ορότυποι **1, 4 και ο 6**, ενώ άλλες οροομάδες και υπότυποι του βακτηρίου απομονώνονται **συχνά από περιβαλλοντικά δείγματα νερού**

Οικολογία των *Legionella* spp.

- Τα είδη *Legionella* είναι κοινά μικρόβια που απαντώνται φυσικά μέσα στο νερό ποταμών, λιμνών και ταμιευτήρων, συνήθως σε μικρούς αριθμούς και επιβιώνουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα
- Όταν το νερό περνάει σε εγκαταστάσεις που συνιστούν μιά τεχνητή αποθήκη, όπως π.χ. νερό σε σωληνώσεις μέσα σε πόλεις, σε συστήματα νερού διαφόρων κτιρίων, ο μικροοργανισμός είναι δυνατόν να πολλαπλασιασθεί σε μεγάλους αριθμούς με επιπτώσεις για τη Δημόσια Υγεία, αν βρει ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη του
- Δύναται να πολλαπλασιαστεί και να επιβιώσει σε βιομεμβράνες

Ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη *Legionella* spp.

- Ιδανική θερμοκρασία (25°C – 45 °C)
- pH
- Ιζήματα
- Συνυπάρχοντες μικροοργανισμοί
- Βιομεμβράνες
- Άλγη
 - **ΔΕΝ** φαίνεται να πολλαπλασιάζεται κάτω από τους 20° C
 - **ΔΕΝ** φαίνεται να μπορεί να επιβιώνει πάνω από τους 63° C

Νόσοι από *Legionella* spp.

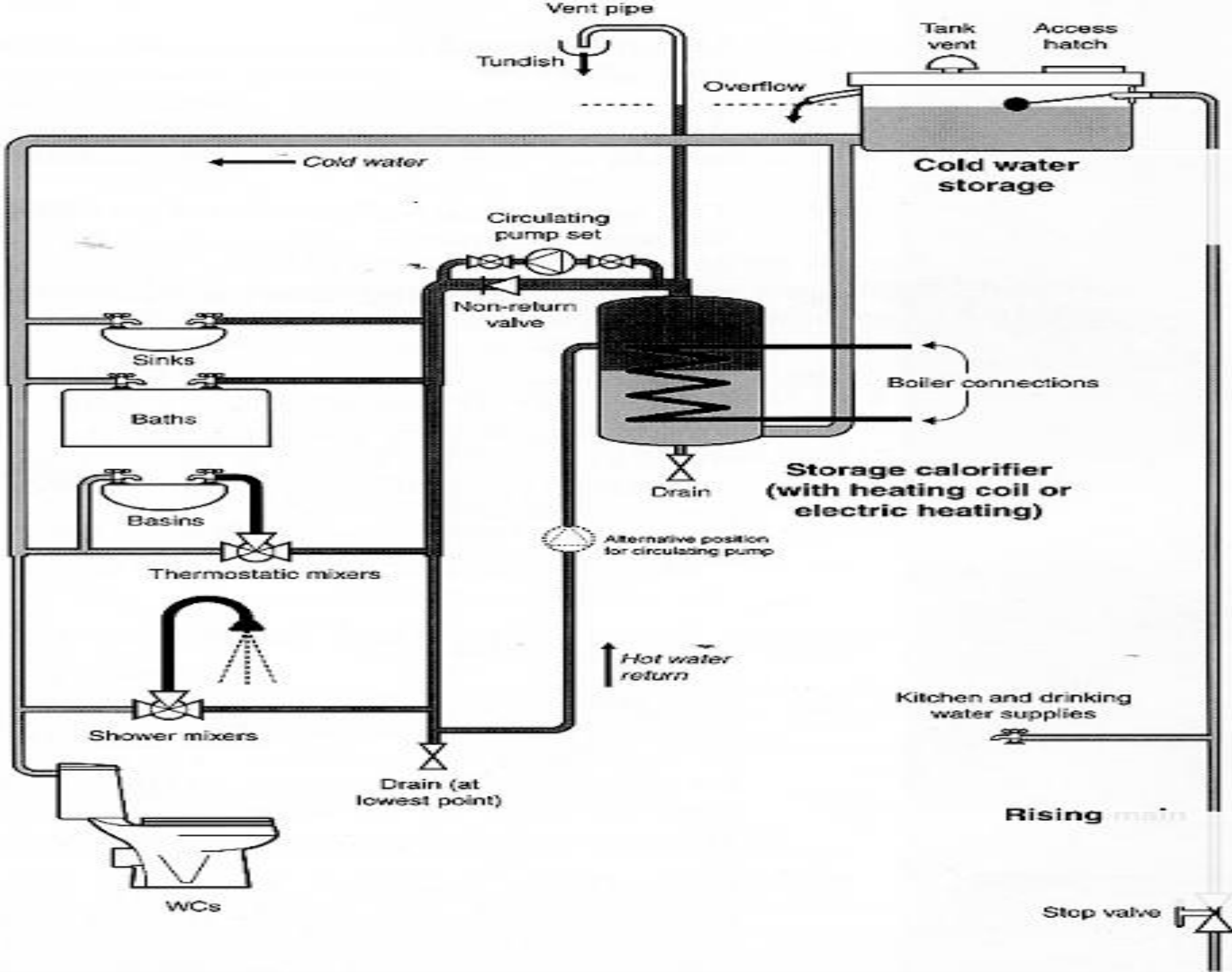
- Πυρετός Pontiac (Pontiac fever)
- Πυρετός Lochgoilhead (Lochgoilhead fever)
- Νόσος των Λεγεωναρίων (Legionnaires' disease)

Τρόποι μετάδοσης

- Η νόσος των Λεγεωναρίων μεταδίδεται κυρίως μέσω του Αναπνευστικού Συστήματος με την **εισπνοή αερολυμάτων/εκνεφωμάτων** (αεροζόλ) **σταγονιδίων** που περιέχουν τον μικροοργανισμό
- Τα αερολύματα σχηματίζονται από τα μικροσκοπικά σταγονίδια που προκύπτουν από:
 - το ψεκασμό νερού
 - την εμφύσηση αέρα μέσα σε νερό
 - τη πρόσκρουση του νερού σε στερεές επιφάνειες
- Όσο **μικρότερα** είναι τα αεροσταγονίδια, τόσο **πιο επικίνδυνα** θεωρούνται και ιδίως όσα είναι διαμέτρου **<5μ**, οπότε φθάνουν στο Κατώτερο Αναπνευστικό Σύστημα πολύ πιο **εύκολα**
- Περίπτωση μετάδοσης της νόσου από **ανθρώπου σε άνθρωπο** **δεν έχει αναφερθεί ποτέ**

Πηγές μετάδοσης

- Συστήματα ύδρευσης κτιρίων κρύου/ζεστού νερού με σύστημα θέρμανσης <math> < 60^{\circ}\text{C}</math> και διανομή νερού στις βρύσες <math> < \text{από } 50^{\circ}\text{C}</math> (κυρίαρχη πηγή λόγω βιομεμβρανών)
- Πύργοι ψύξης
- Εξατμιστικοί συμπυκνωτές
- Ψύκτες με υγρά, που μέσω της εξάτμισης αποβάλλουν θερμότητα
- Υγραντές/Clinical Humidifiers
- Διακοσμητικά συντριβάνια
- Φυσικές θερμές πηγές/Ιαματικά λουτρά
- Spa
- Τζακούζι
- Μπανιέρες υδρομασάζ
- Προθήκες τροφίμων/λαχανικών με καταιονητήρες
- Ο οδοντιατρικός εξοπλισμός
- Τα συστήματα ποτίσματος



Αποικισμός από *Legionella* spp.

- Τα είδη *Legionella* **αποικίζουν** συστήματα κυκλοφορίας νερού, όπως δεξαμενές αποθήκευσης, θερμοσίφωνες, σωλήνες, δεξαμενές θερμού νερού, βρύσες, ακροφύσια στα ντους και φίλτρα νερού
- Σε **αντίθεση** με τα υδρόψυκτα, τα αερόψυκτα συστήματα κλιματισμού (air-condition), **δεν συνιστούν** πηγές μετάδοσης του βακτηριδίου

Που δημιουργούνται βιομεμβράνες

- Σχεδόν σε όλες τις επιφάνειες
- Σε λάστιχα, πλαστικούς σωλήνες/ενώσεις, πλαστικά κεφάλια καταιονητήρων
- Σε σκουριά, πετρώματα
- Σε αδιέξοδα σημεία του συστήματος ύδρευσης κτιρίων
- Σε δεξαμενές αποθήκευσης νερού

Contaminated storage tank



Sand and sludge in storage tanks

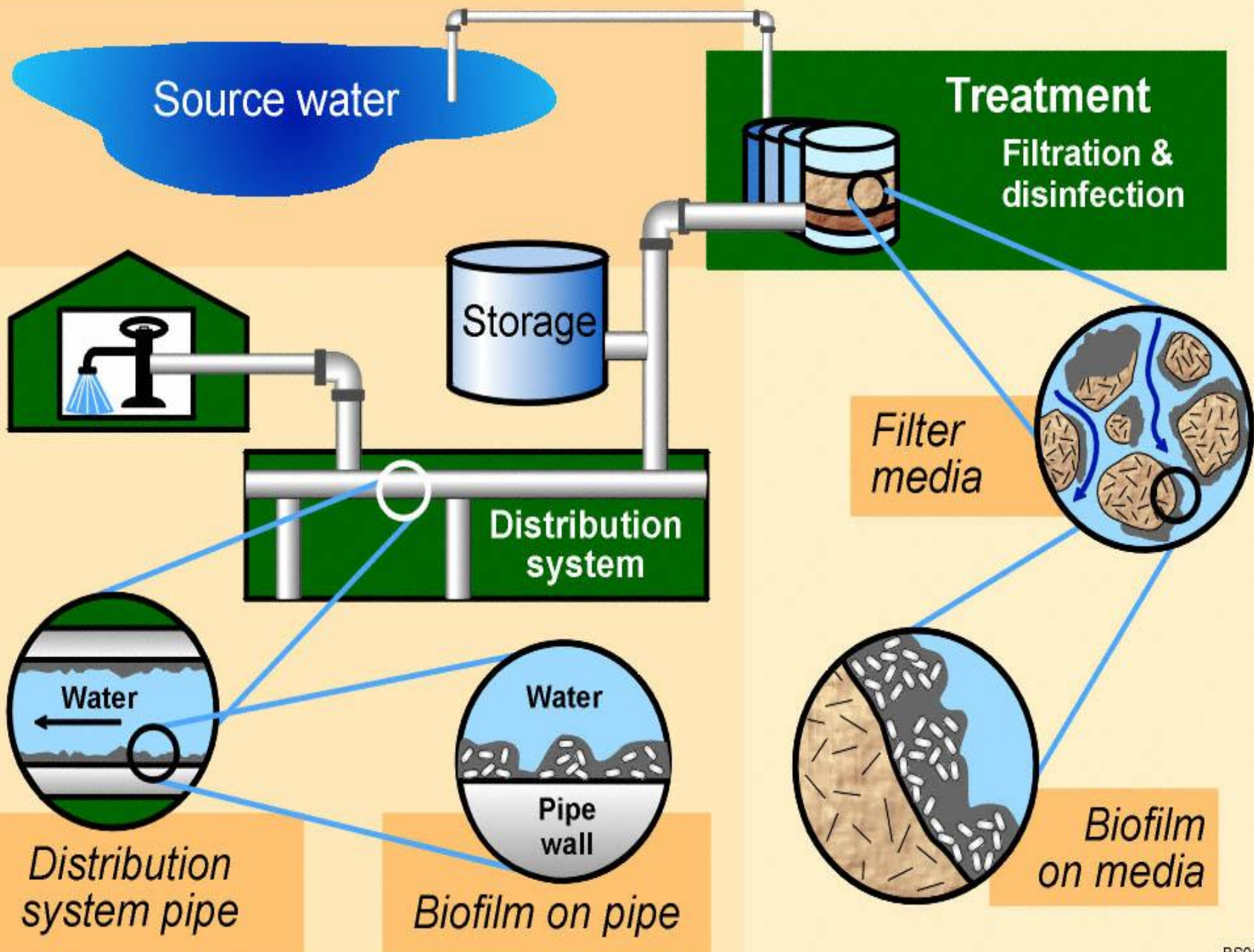


Παράγοντες που συνδράμουν στη δημιουργία βιομεμβρανών

- **Ίχνη θρεπτικών** ουσιών στο νερό
- **Στερεές επιφάνειες** (φυσικά >συνθετικά> ατσάλι> χαλκός)
- **Κακός σχεδιασμός** —δύσκολη συντήρηση
- **Στάσιμο νερό ή μικρή ροή**, μεγάλες δεξαμενές αποθήκευσης, κύλινδροι πίεσης, αδιέξοδα σημεία δικτύου
- Μεγάλη αναλογία επιφάνειας/όγκου
- Φυσικοχημικές συνθήκες
 - Θερμοκρασία 30° C – 45° C
 - Ύπαρξη πέτρας και σκουριάς

Βιοϋμένια (Biofilms)





Δειγματοληψία

- Δειγματοληπτικός εξοπλισμός
- Πρωτόκολλα δειγματοληψίας
- Προστατευτικός εξοπλισμός
- Εκπαιδευμένοι δειγματολήπτες που πρέπει να έχουν τις απαραίτητες γνώσεις πάνω στην **ορθή διαδικασία** δειγματοληψίας και στη λήψη **αντιπροσωπευτικών** δειγμάτων
- Πως να προστατεύσουν **το δείγμα**
- Πως να προστατεύσουν τον **εαυτό τους** από τυχόν επιμόλυνσεις κατά τη δειγματοληψία

Δειγματοληψία

- Οι οδηγίες δειγματοληψίας, βασίσθηκαν στα:
 - **EWGLI** - European Working Group for *Legionella* Infections
<http://www.ewgli.org/>
 - **CDC** Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. June 6, 2003.
 - **OSHA** – Occupational Safety & Health Administration (USA) <http://www.osha.gov/>

Δειγματοληπτικός εξοπλισμός

- Αδιαφανή αποστειρωμένα μπουκάλια στους 121°C για 15 min, γυάλινα ή πολυπροπυλενίου μίας χρήσεως (όγκου 500-1000ml) που να περιέχουν 10mg Μεταθειώδους Νατρίου
- Ψηφιακό θερμόμετρο εύρους (10 °C – 90 °C)
- Χλωριόμετρο
- Ψυγείο για μεταφορά και παγοκύστεις
- Προστατευτική μάσκα
- Γάντια μιας χρήσεως
- Βαμβακοφόροι στυλεοί/swabs διαφόρων μεγεθών

Δειγματοληπτικός εξοπλισμός

- Χαρτί για στέγνωμα επιφανειών και χεριών
- Διάφορα εργαλεία—κατσαβίδια, πένσες, κ.λ.π.
- Διάφοροι πλαστικοί σωλήνες διαμέτρου 10-25mm
- Αλκοόλη 70%
- Ετικέτες σήμανσης δειγμάτων
- Έντυπα δειγματοληψίας

Πρωτόκολλο λήψης δειγμάτων νερού

Επιθεώρηση κτιρίου

- Εκτίμηση μεγέθους κτιρίου και των **συστημάτων κυκλοφορίας νερού** (απλό διάγραμμα)

Υπολογισμός αριθμού δειγμάτων και φιαλών

Σημειώσεις:

- **Σημείο εισαγωγής** δικτύου ύδρευσης ή ιδιωτικής πηγής
- **Σημείο δεξαμενής αποθήκευσης**, συστήματος **επεξεργασίας** και **αντλιών**
- **Σημείο θερμοσίφωνα** (heater) και **λέβητα** (boiler)
- **Είδη εξαρτημάτων** του συστήματος (βρύσες, καταιονητήρες, βαλβίδες) και **υλικό κατασκευής** των σωλήνων
- **Σημεία πύργων ψύξης**, εξατμιστικών **συμπυκνωτών** και **ψυκτών** του κτιρίου
- **Θέση και τύπος των συστημάτων** που σχετίζονται με τους πύργους ψύξης, όπως δεξαμενές, συμπυκνωτές και σπειράματα ψύξης έμμεσης εξάτμισης στις μονάδες κλιματισμού
- **Θέση κάθε συστήματος ψύξης** με εξάτμιση και θέση υγραντήρων
- **Θέση διακοσμητικών συντριβανιών**, κολυβητικών δεξαμενών, των οποιονδήποτε δεξαμενών εμβάπτισης, καταιονητήρων οφθαλμών, καταιονητήρων ασφαλείας, ή οποιονδήποτε άλλων πηγών νερού εντός ή πλησίον του κτιρίου

Πρωτόκολλο λήψης δειγμάτων νερού

- Σχεδιασμός διαδρομής που θα ακολουθήσει ο έλεγχος, από το σημείο εισαγωγής του νερού
- Καταγραφή κατάστασης σωλήνων, μεθόδου σύνδεσης σωλήνων, μόνωσης, πηγών θερμότητας, και είδους μόνωσης στις δεξαμενές νερού
- Προσεκτικός έλεγχος και καταγραφή σημείων και είδους αποσυνδεδεμένων εξαρτημάτων, τερματικών σημείων και συνδέσεων με άλλα συστήματα
- Όλα τα δείγματα λαμβάνονται **ΠΡΙΝ** από οποιαδήποτε διαδικασία εξυγίανσης του συστήματος, είτε πρόκειται για διαδικασία ρουτίνας είτε για διερεύνηση επιδημίας

Σημεία Λήψης Δειγμάτων

- Την εισαγωγή νερού
- Από καθε δεξαμενή και θερμοσίφωνα
- Από ένα αντιπροσωπευτικό αριθμό βρυσών κρύου και ζεστού νερού
- Από **όλους** τους πύργους ψύξης, τους εξατμιστικούς συμπυκνωτές, τους υγραντήρες, τα sra, τους καταιονητήρες
- Από την **είσοδο ή έξοδο** νερού οποιασδήποτε συσκευής ύποπτης για μόλυνση
- Σημείωση:
 - Οποιαδήποτε πηγή νερού είχε **εμπλοκή σε επιδημία** στο παρελθόν, ή έχει βρεθεί μολυσμένη ή υπάρχει υποψία για πιθανή μόλυνση, θα πρέπει να ελέγχεται κι όχι να αγνοείται
 - Κατά τη διάρκεια μιάς διερεύνησης είναι πολύ σημαντικό να **μην αφήσουμε καμία πηγή νερού** του κτιρίου χωρίς να ελεγχθεί

Τρόπος Δειγματοληψίας-Πύργοι Ψύξης

- Κατά τη λειτουργία του πύργου ψύξης σχηματίζονται **σταγονίδια** τα οποία μεταφέρονται στο περιβάλλον του κτιρίου μέσω του **εισαγωγέα αέρος** του κτιρίου
- Η διαδικασία δειγματοληψίας ξεκινάει **30 λεπτά** της ώρας, αφότου **σταματήσει** η λειτουργία του πύργου ψύξης
- Δείγματα από:
 - την **εισαγωγή του** νερού στον πύργο, την κάθε **αποθηκευτική δεξαμενή** του συστήματος, τη **λεκάνη-δεξαμενή** (basin) του πύργου στο πιο απομακρυσμένο σημείο από την εισαγωγή, αλλά και από το νερό που επιστρέφει από το σύστημα κυκλοφορίας, στο σημείο εισαγωγής ,στον πύργο
 - Από κάθε **σημείο στάσιμου νερού** στους δίσκους συμπύκνωσης ή από τα σπειράματα ψύξης
- (Με τη βοήθεια του συντηρητή παίρνουμε δείγματα νερού μέσα από τον πύργο ψύξης, συνήθως μέσω θυρίδας επίσκεψης της δεξαμενής του πύργου ψύξης)

Τρόπος Δειγματοληψίας-Υγραντήρες, Εξατμιστικοί Συμπυκνωτές, Ψύκτες, Spa

- Συλλογή δειγμάτων από τη **δεξαμενή νερού** και αν υπάρχει πρόσβαση, από το σημείο εισαγωγής
- Λήψη δειγμάτων **λάσπης ή ιζήματος**, ιδιαίτερα όπου υπάρχουν συσσωρεύσεις

Spas



Commercial



Domestic

Πρόπος Δειγματοληψίας- Συστήματα Κυκλοφορίας Νερού Ανθρώπινης Κατανάλωσης

- Κατά προτίμηση, δείγματα νερού συλλέγουμε από την **κεφαλή του καταιωνητήρα**
- Επιβάλλεται τουλάχιστον, **μία δειγματοληψία σε κάθε όροφο** του κτιρίου και η λήψη γίνεται από **δύο σημεία**: το κοντινότερο και το πιο απομακρυσμένο σημείο του δικτύου του κτιρίου
- Εξετάζονται κυρίως τα **λιγότερο χρησιμοποιούμενα** σημεία ή τα πιο **‘ευαίσθητα’** τμήματα, όπως για παράδειγμα, αν πρόκειται για νοσοκομείο, η Μονάδα Εντατικής Θεραπείας, η Μονάδα Μεταμοσχεύσεων κ.λ.π.
- **Έλεγχος θερμοκρασίας** ώστε να διαπιστωθεί αν είναι σημαντικά χαμηλότερη από την επιλεγμένη
- **Δεν ξεπλένεται η βρύση**, πριν τη λήψη του δείγματος, διότι το τελικό τμήμα του συστήματος ύδρευσης, μπορεί να αποτελεί μολυσματική πηγή

Τρόπος Δειγματοληψίας- Συστήματα Κυκλοφορίας Κρύου Νερού

- Είδος δείγματος: Παίρνουμε **δύο (2) δείγματα** τουλάχιστον των 500ml το καθένα
- Λήψη **άμεσου** δείγματος (μόλις ανοίξουμε τη βρύση)
- **Μέτρηση θερμοκρασίας** με το ψηφιακό θερμόμετρο από τη παροχή και όχι από τη φιάλη με το δείγμα, ή χρήση ξεχωριστού κυπέλλου-περιέκτη, ο οποίος θα αλλάζει σε κάθε δείγμα
- Απολύμανση θερμομέτρου με ισοπροπυλική αλκοόλη για την αποφυγή επιμόλυνσης των επόμενων δειγμάτων
- Αναμονή σταθεροποίησης για καταγραφή της τελικής θερμοκρασίας και του χρόνου έως τη σταθεροποίηση
- Λήψη **έμμεσου** δείγματος (μετά από **ροή δύο λεπτών**)
- Με το κατάλληλο σύστημα προσδιορισμού του **υπολειμματικού χλωρίου** γίνεται μέτρηση του

Τρόπος Δειγματοληψίας

- Το **άμεσο** δείγμα θα παρουσιάσει το **επίπεδο μόλυνσης** στο **εξάρτημα** ή το **σημείο**
- Το **έμμεσο** θα δείξει τη **ποιότητα του νερού** που φθάνει στο **σημείο** αυτό

Τρόπος Δειγματοληψίας- Συστήματα Κυκλοφορίας Ζεστού Νερού

- Είδος δείγματος: Παίρνουμε **δύο (2) δείγματα** τουλάχιστον των 500ml το καθένα
- Λήψη **άμεσου** δείγματος (μόλις ανοίξουμε τη βρύση)
- **Μέτρηση θερμοκρασίας** με το ψηφιακό θερμόμετρο από τη παροχή και όχι από τη φιάλη με το δείγμα, ή χρήση ξεχωριστού κυπέλλου-περιέκτη, ο οποίος θα αλλάζει σε κάθε δείγμα
- Απολύμανση θερμομέτρου με ισοπροπυλική αλκοόλη για την αποφυγή επιμόλυνσης των επόμενων δειγμάτων
- Αναμονή σταθεροποίησης για καταγραφή της τελικής θερμοκρασίας και του χρόνου έως τη σταθεροποίηση
- Λήψη **έμμεσου** δείγματος (μετά από **ροή ενός λεπτού**)

Τρόπος Δειγματοληψίας- θερμοσίφωνες νερού ανθρώπινης κατανάλωσης

- Δείγματα από:
 - τον **πυθμένα** (bottom drain)
 - τον **εξωτερικό σωλήνα**, αν υπάρχει δυνατότητα

Τρόπος Δειγματοληψίας-Λέβητες Θέρμανσης (Boilers)

- Είδος δείγματος: Παίρνουμε **δύο (2) δείγματα**
- **A) Στην είσοδο νερού** στον λέβητα θέρμανσης ή στο κοντινότερο σημείο προς αυτήν
- **Μετράμε τη θερμοκρασία** με το ψηφιακό θερμόμετρο
- Για να εξασφαλίσουμε τη μη επιμόλυνση του δείγματος χρησιμοποιούμε ξεχωριστό κύπελλο-περιέκτη
- Δεν μετράμε υπολειμματικό χλώριο
- **B) Πριν την επιστροφή** στο λέβητα θέρμανσης ή στο κοντινότερο σημείο προς αυτήν
- **Μετράμε τη θερμοκρασία** με το ψηφιακό θερμόμετρο.
- Για να εξασφαλίσουμε τη μη επιμόλυνση του δείγματος χρησιμοποιούμε ξεχωριστό κύπελλο-περιέκτη
- Δεν μετράμε υπολειμματικό χλώριο

Τρόπος Δειγματοληψίας- με αποστειρωμένο μάκτρο (στυλεό) από Συστήματα Κυκλοφορίας Νερού Ανθρώπινης Κατανάλωσης

- **Απομακρύνουμε τα ανάλογα εξαρτήματα** από τις βρύσες και τις κεφαλές των καταιωνητήρων και λαμβάνουμε δείγματα από τα **εσωτερικά τοιχώματά τους**, με τη χρήση αποστειρωμένου **βαμβακοφόρου στυλεού**, κάνοντας περιστροφικές κινήσεις
- Η δειγματοληψία των σωλήνων των καταιωνητήρων, γίνεται **στο σημείο σύνδεσης** των συναρμολογούμενων εξαρτημάτων τους
- Τοποθετούμε τον βαμβακοφόρο στυλεό σε **μικρά αποστειρωμένα φιαλίδια** (των 50ml), αφού πρώτα γεμίζουμε το κάθε ένα με **5-10ml από το ίδιο το νερό** του σημείου δειγματοληψίας
- **ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Σε περίπτωση που ένας καταιωνητήρας ή βρύση **δε χρησιμοποιείται πρέπει να γίνει** δειγματοληψία, γιατί είναι πολύ πιθανό να έχει **αποικιστεί** το σημείο και σε περίπτωση **πτώσης της πίεσης** του νερού μπορεί το αποικισμένο νερό να **επιμολύνει το υπόλοιπο δίκτυο**

Μεταφορά των δειγμάτων

- Τύλιγμα με λαστιχάκι, parafilm, ή άλλο τρόπο, π.χ. σπάγκος, του λαιμού κάθε φιάλης δειγματοληψίας, ώστε το καπάκι να είναι σφικτά στη θέση του
- Τύλιγμα με απορροφητικό χαρτί γύρω από κάθε φιάλη και τοποθέτηση σε ασφαλή πλαστική σακούλα με αεροκυψέλες
- Τοποθέτηση τους σε **ισοθερμικό κιβώτιο**
- Τα δείγματα διατηρούνται σε **θερμοκρασίες 6-18°C** και προστατευμένα από την άμεση πρόπτωση του ηλιακού φωτός, αν πρόκειται να εξετασθούν **εντός 24h**
- Αν δεν αναλυθούν άμεσα, αλλά ο έλεγχος πρόκειται να γίνει **εντός 48h**, που είναι και το ανώτερο όριο αποδοχής των δειγμάτων, πρέπει να φυλάσσονται σε συνθήκες **συντήρησης εντός ψυγείου** και **να μην καταψύχονται, στους 2-8 °C**, όπως προβλέπεται από τη μέθοδο κατά ISO 11731 και ISO 19458

Διερεύνηση επιδημίας

- **Αποσόβηση** άλλων κρουσμάτων
- Καταστήστε την **περιοχή** των κρουσμάτων ασφαλή με την **απομόνωση** της
- **Δειγματοληψία**
- **Προληπτική άμεση απολύμανση** του συστήματος εάν κριθεί αναγκαία
- Επαναχρησιμοποίηση **μόνο μετά την επιβεβαίωση** ότι το σύστημα είναι ασφαλές

Αξιολόγηση των στοιχείων του συστήματος

- Να είστε **συστηματικοί**
- Αρχίστε από την **αρχή** του συστήματος και προχωρείστε στις **εξόδους**
- Να θυμάστε πάντα τους **παράγοντες** που βοηθούν τον πολλαπλασιασμό του βακτηρίου *Legionella*—βιομεμβράνες, θερμοκρασία, υλικά σωλήνων, νεκρά σημεία του συστήματος κ.λ.π.
- **Μην θεωρείτε** ότι τα στοιχεία που σας έχουν δοθεί είναι **πάντα σωστά**. Κάνετε τους δικούς σας ελέγχους όπου αυτό είναι δυνατόν
- Πάντα μετράτε τις **θερμοκρασίες**

Νομικό πλαίσιο

- Μη ειδικό
- Εγκύκλιοι Υπουργείου Υγείας & Κοινωνικής Αλληλεγγύης (2 φορές/έτος ο έλεγχος εφόσον όλα είναι «καλά»-σύστημα εντός ελέγχου)
- **ΑΝΑΓΚΗ ΓΙΑ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗΣ ΝΟΜΟΘΕΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗ ΛΕΓΕΩΝΕΛΛΑ**

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ

- **Πλήρης και σαφής** εκτίμηση του κινδύνου είναι το πρώτο και κύριο βήμα
- Μεταξύ άλλων, πρέπει να προσδιορίζονται τα εξής:
 - Υπάρχουν οι **κατάλληλες συνθήκες** για τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων (π.χ. θερμ. 20-45 °C);
 - Υπάρχουν **«τυφλά σημεία»** στο δίκτυο (π.χ. σωλήνωση που οδηγεί σε συσκευή που δε χρησιμοποιείται);
 - Βρύσες – ντους που **δε χρησιμοποιούνται** συχνά;
 - **Ιζήματα, σκουριά, βιομεβράνες** στο δίκτυο;
 - Υπάρχουν εργαζόμενοι, ένοικοι, επισκέπτες κ.λ.π. **ιδιαίτερα ευαίσθητοι** στη λοίμωξη, π.χ. ηλικιωμένοι, ασθενείς;

Typical written scheme: H & C Water Systems checks

- Weekly - flushing little used outlets
- Monthly – temperature checks
- Quarterly - shower cleaning
- Six monthly – Cold Water Storage Tank temperatures
- Annually - CWS Tank inspections, calorifier checks

Μικροβιολογικός έλεγχος ; Πότε και γιατί ; Πόσο ;

- **Απουσία** διεθνούς κοινής θέσης
- CDC: ΔΕΝ θεωρεί ότι αξίζει τον κόπο
- ΕΥΡΩΠΗ: ΝΑΙ σε διάφορες εκδοχές (ιδίως για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των μέτρων ελέγχου-απολύμανσης)
π.χ.:
 - Συστήματα Κυκλοφορίας Ζεστού Νερού με θερμοκρασία εντός του φάσματος ανάπτυξης των βακτηρίων
 - Συστήματα Κυκλοφορίας Νερού με βιοκτόνες ουσίες κάτω των απαιτούμενων συγκεντρώσεων
 - Επί επιδημικής έκρηξης ή επί υποψίας επιδημικής έκρηξης
 - Σε πτέρυγες ή νοσοκομεία ή Χ.Π.Υ.Υ. με υψηλού κινδύνου ασθενείς, π.χ. ανοσοκατασταλμένους

Αστοχίες του πρωτοκόλλου (εφαρμοζόμενης πολιτικής για *Legionella*)

- Ακατάλληλο πρωτόκολλο δειγματοληψίας (π.χ. πάντα ίδιο σημείο)
- Απουσία τεκμηρίωσης του πρωτοκόλλου εκτίμησης κινδύνου (δικαστικές διώξεις...)
- **Ανεπαρκής καθαρισμός** των κεφαλών των καταιονητήρων, των μπάνιων
- Χώροι με καταιονητήρες που χρησιμοποιούνται ως **αποθηκευτικοί χώροι**
- **Υγραντήρες** γεμισμένοι με νερό βρύσης
- Υγραντήρες οξυγόνου που έχουν **πλυθεί με νερό βρύσης** μεταξύ των διαδοχικών χρήσεων
- **Υπερβολικός** αριθμός νιπτήρων
- Γενικότερος **κακός σχεδιασμός**
- **Δεξαμενές, Spa, κ.λ.π.**

Προσοχή

- Τα μέτρα ελέγχου παρακολουθούνται και αναθεωρούνται τακτικά για:
 - Αλλαγές που αφορούν
 - Το είδος της απολύμανσης
 - Τις επικρατούσες περιβαλλοντικές συνθήκες

ΟΡΙΑ ΓΙΑ *Legionella* spp.

- Με βάση τις Ευρωπαϊκές Οδηγίες για τον Έλεγχο και τη Πρόληψη των Λοιμώξεων από *Legionella* spp. της **EWGLI – European Working Group for *Legionella* Infections**, που είναι σε ισχύ από τον Ιούνιο 2003
- Τις οδηγίες επιμελήθηκε ο Επιστημονικός Συνεργάτης του Τομέα Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας της Ε.Σ.Δ.Υ. & Αναπληρωτής Επιστημονικός Υπεύθυνος του Κ.Ε.Δ.Υ.,
Δρ. ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ Ν. ΒΕΛΟΝΑΚΗΣ

Όρια για ενέργειες μετά από εξέταση για Ετερότροφα Βακτήρια / *Legionella* για μικροβιολογική παρακολούθηση των Πύργων Ψύξης (Π.Ψ.)

- 1) Αν τα
 - Ετερότροφα Βακτήρια (E.B.) είναι <math><10,000</math>
 - και οι
 - Λεγεωνέλλες <math><1,000</math> τότε:
- Το σύστημα θεωρείται ότι είναι υπό έλεγχο.
- 2) Αν τα
 - E.B. είναι $>10,000$ και <math><100,000</math>
 - και οι
 - Λεγεωνέλλες $>1,000$ και <math><10,000</math> τότε:

Το πρόγραμμα λειτουργίας του /των Π.Ψ. πρέπει να αναθεωρηθεί.

Η μέτρηση θα πρέπει να επιβεβαιωθεί με ΑΜΕΣΗ επανάληψη της δειγματοληψίας.

Αν βρεθούν παρόμοιοι αριθμοί μικροβιακού φορτίου ξανά,

θα πρέπει να επανεξετασθούν τα μέτρα ελέγχου και

να επαναπροσδιοριστεί ο βαθμός κινδύνου, έτσι ώστε

να βρεθούν οι επανορθωτικές ενέργειες που πρέπει να γίνουν.

- 3) Αν τα
 - E.B. είναι $>100,000$
 - και οι
 - Λεγεωνέλλες $>10,000$ τότε:

Το σύστημα θα πρέπει να επαναιγματοληπτηθεί ΑΜΕΣΑ και μετά θα πρέπει να του γίνει χορήγηση shock κατάλληλης βιοκτόνου ουσίας, ως προληπτικό μέτρο.

θα πρέπει να γίνει εκτίμηση του κινδύνου και

τα μέτρα ελέγχου θα πρέπει να αναθεωρηθούν, έτσι ώστε

να προσδιοριστούν οι διορθωτικές ενέργειες που πρέπει να γίνουν.

Όρια για ενέργειες που πρέπει να ακολουθήσουν σε κτίρια, μετά από δειγματοληψία για *Legionella* σε Συστήματα Κυκλοφορίας ζεστού και κρύου Νερού (ΣΚΖ-κΝ) Αποικίες *Legionella* (cfu/litre)

1) Αν οι αποικίες είναι περισσότερες από 1,000 , αλλά λιγότερες από 10,000

A Αν είναι θετικά μόνο ένα ή δύο από τα δείγματα, το/τα **ΣΚΖ-κΝ** πρέπει να δειγματοληπτηθούν και πάλι.

10 Αν επαναληφθεί η ίδια εικόνα από πλευράς αριθμού θετικών δειγμάτων, τότε
10 πρέπει να επανεξετασθούν τα μέτρα ελέγχου και
10 να επαναπροσδιοριστεί ο βαθμός κινδύνου,
10 έτσι ώστε να βρεθούν οι επανορθωτικές ενέργειες που πρέπει να γίνουν.

B Αν η πλειοψηφία των δειγμάτων είναι θετικά, το/τα **ΣΚΖ-κΝ** μπορεί να θεωρηθεί ως αποικισμένο, αν και σε χαμηλό βαθμό, με Λεγεωνέλλα.
10 Πρέπει να εξετασθεί η απολύμανση του/των **ΣΚΖ-κΝ** και
10 πρέπει ΑΜΕΣΑ να επανεξετασθούν τα μέτρα ελέγχου και
10 να επαναπροσδιοριστεί ο βαθμός κινδύνου,
10 έτσι ώστε να βρεθούν οι επανορθωτικές ενέργειες που πρέπει να γίνουν.

2) Αν οι αποικίες είναι περισσότερες από 10,000

Το/τα **ΣΚΖ-κΝ** πρέπει να δειγματοληπτηθούν και πάλι και να επανεξετασθούν τα μέτρα ελέγχου και να επαναπροσδιοριστεί ο βαθμός κινδύνου, έτσι ώστε να βρεθούν οι επανορθωτικές ενέργειες που πρέπει να γίνουν, συμπεριλαμβανόμενης της/των απολύμανσης/ων του/των **ΣΚΖ-κΝ**.

Οι προτάσεις για τις διαδικασίες απολύμανσης νερού των δικτύων για καταπολέμηση *Legionella* spp.

- α) Συστήματα ζεστού και κρύου νερού (συνοπτικά)
 - **Θερμικό σοκ** (70-80 °C) για 3 ημέρες
 - **Συνεχής διατήρηση** της θερμοκρασίας του νερού στους 55-60 °C
*(Επιτυγχάνεται 90% μείωση του αριθμού της *L. pneumophila* εντός 2 λεπτών της ώρας)
 - Χρήση **Οξειδωτικών Βιοκτόνων** ουσιών
 - **Χλωρίωση** (Χλωρίωση σοκ – Υπερχλωρίωση και Συνεχής χλωρίωση), Διοξείδιο του χλωρίου, Μονοχλωραμίνη *(Οι ανώτερες παραδεκτές τιμές για το ε.υ.χ. στο κρύο νερό είναι 0.5 mg/l)
 - **Ιονισμός** (ηλεκτρόλυση ιόντων χαλκού, αργύρου)
 - **Υπεροξείδιο υδρογόνου** με άργυρο
 - **Υπεριώδης ακτινοβολία (UV)**-254nm

Οι προτάσεις για τις διαδικασίες απολύμανσης νερού των δικτύων για καταπολέμηση *Legionella* spp.

β) Πισίνες-Spa (συνοπτικά)

- Συνεχές φιλτράρισμα του νερού
- Απολύμανση με χλώριο (1-2 mg/l)
- Βρώμιο (1-2 mg/l) και συνεχής μέτρησή τους
- Χρήση φίλτρου άμμου στα Spa δημόσιας χρήσης
- Ανακυκλοφορία του νερού κάθε 24ωρο και καθημερινή αντικατάσταση του ½ νερού τουλάχιστον

γ) Πύργοι Ψύξης (συνοπτικά)

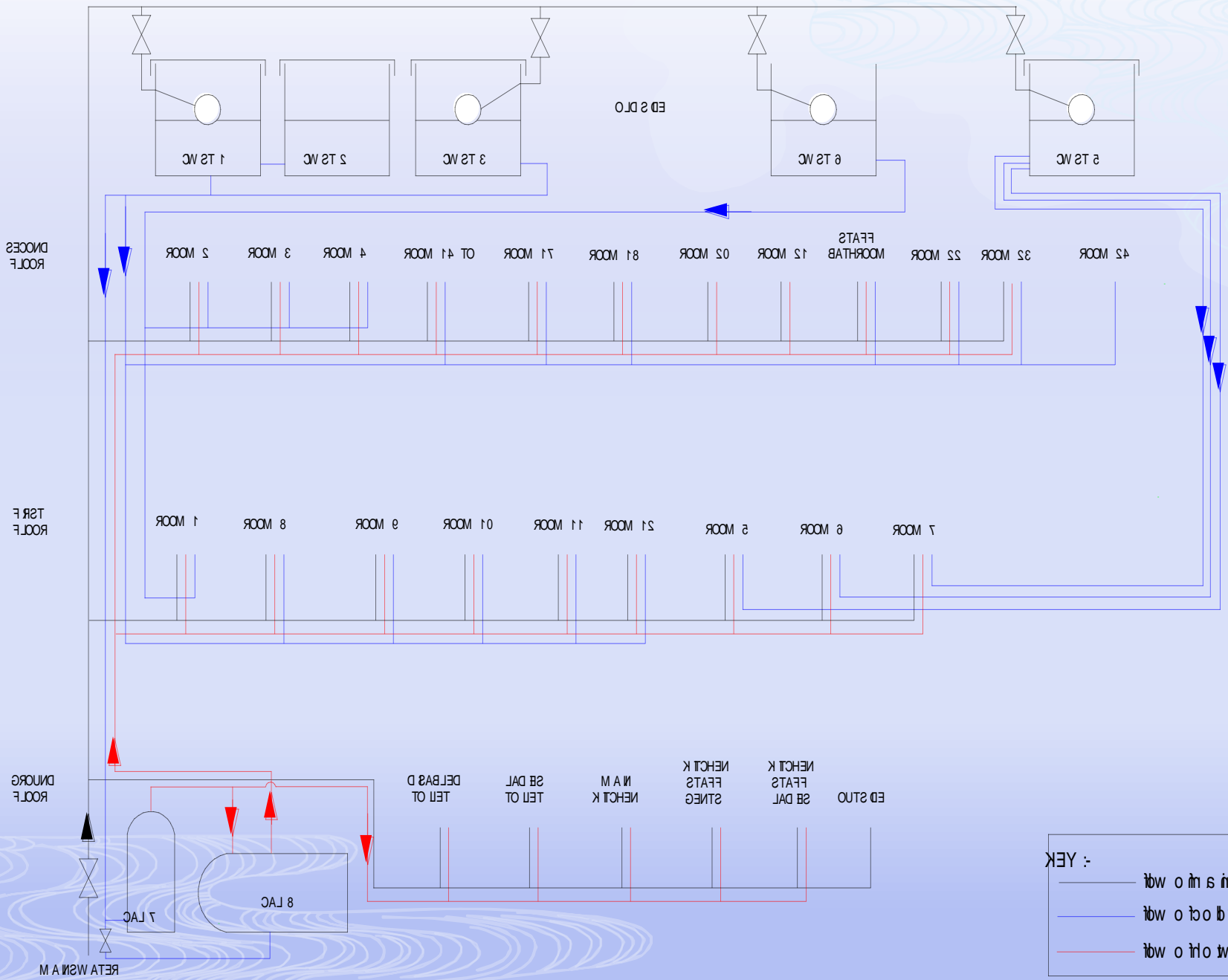
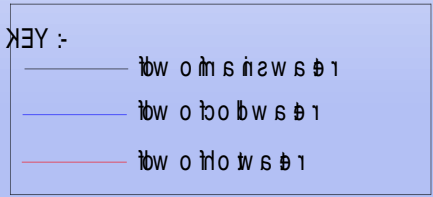
- Εξυγίανση με υπερχλωρίωση και αποχλωρίωση (Θειοθειικό Νάτριο- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

Άσκηση

Ξενοδοχειακή Μονάδα με τη συγκεκριμένη απεικόνιση του υδραυλικού της συστήματος.

Στο δωμάτιο 1 του 1^{ου} ορόφου σημειώθηκε 1 κρούσμα της Νόσου των Λεγεωναρίων, όπως επίσης και άλλο 1 κρούσμα σημειώθηκε στο δωμάτιο 4 του 2^{ου} ορόφου (βλέπε σχεδιάγραμμα).

Επειδή δεν διαθέτετε μεγάλο αριθμό φιαλών δειγματοληψίας, παρακαλείσθε να επιλέξετε τα πρώτα 15 δείγματα νερού με τα οποία θα δειγματοληπτείσετε το ξενοδοχείο, λαμβάνοντας υπόψη την ύπαρξη των συγκεκριμένων κρουσμάτων.



Απάντηση

Δωμάτιο 1 (κρούσματος) : 4 δείγματα

Δωμάτιο 4 (κρούσματος) : 4 δείγματα

Δεξαμενή κρύου νερού no6 : 1 δείγμα

Λέβητας no8 : 2 δείγματα

Δωμάτιο 3 (γειτνιάζει με 1 από τα δωμάτια των κρουσμάτων) : 4 δείγματα

Συνολικά : 15 δείγματα στην 1^η δειγματοληψία

Διερεύνηση λοιμώξεων από *Legionella* spp.

- Η “gold standard” μέθοδος για την απομόνωση των στελεχών του βακτηρίου είναι η **καλλιέργεια** των δειγμάτων, περιβαλλοντικών και κλινικών σύμφωνα με τα ISO 11731:1998 και ISO 11731-2:2004.

- Η καλλιέργεια των δειγμάτων παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα όπως:

- τον μεγάλο χρόνο επώασης του βακτηρίου, χρειάζονται περίπου 10 ημέρες για να δωθεί το τελικό αποτέλεσμα
- και την δύσκολη έως αδύνατη ταυτοποίηση όλων των στελεχών του βακτηρίου του δείγματος, λόγω της ύπαρξης βιώσιμων αλλά μη καλλιεργήσιμων στελεχών.

- Συγχρόνως, οι **τεχνικές μοριακής βιολογίας** αποτελούν σημαντικά **επιδημιολογικά εργαλεία** στην διερεύνηση λοιμώξεων από *Legionella* spp., δίνοντας τη δυνατότητα για **γρήγορη ανίχνευση** του βακτηρίου σε **κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα** και την ανεύρεση των κλώνων των βακτηρίων στα αντίστοιχα δείγματα.

- Στην διερεύνηση μιας επιδημικής έξαρσης από *Legionella* spp., γίνεται χρήση συνδυαστικά και των μεθόδων καλλιέργειας και των μοριακών τεχνικών για αυτό το σκοπό.

- Οι μοριακές τεχνικές για *Legionella pneumophila* και spp. που χρησιμοποιούνται είναι:

- η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR και η PCR πραγματικού χρόνου ή real-time PCR που δίνει και ποσοτικά αποτελέσματα (διαθέσιμα διάφορα εμπορικά kits).

Διερεύνηση λοιμώξεων από *Legionella* spp.

- Σημαντικό **πλεονέκτημα** των μοριακών μεθόδων είναι άμεση απόδοση αποτελέσματος σε σχέση με την καλλιέργεια, σε **1-2 ημέρες** και βασικό τους μειονέκτημα η **αδυναμία διάκρισης μεταξύ ζώντων και νεκρών** βακτηριακών κυττάρων.
- Ειδικά στα περιβαλλοντικά δείγματα, ένα θετικό αποτέλεσμα είναι ενδεικτικό της διάδοσης του βακτηρίου στο δίκτυο παροχής νερού μιας μονάδας, χωρίς να είναι δυνατό να διακρίνεται αν είναι ζων ή νεκρό.
- Δεν έχει βρεθεί μέχρι στιγμής κάποια μοριακή μέθοδος που να δύναται να αντικαταστήσει επαρκώς την καλλιέργεια.
- Η **τυποποίηση του γενετικού υλικού** επιτυγχάνεται μέσω διαφόρων πρωτοκόλλων, όπως την **μέθοδο SBT (sequence-based typing)**-τυποποίηση με διαδοχική αλληλούχιση για στελέχη *L. pneumophila* και έχει αναπτυχθεί από το **ESGLI-European Study Group for Legionella Infections**. Η τελευταία έκδοση του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου είναι το SBT protocol for epidemiological typing of *L. pneumophila* version 5.0.

Διερεύνηση λοιμώξεων από *Legionella* spp.

- Μέσω του SBT πρωτοκόλλου και όταν απομονώνεται *L. pneumophila* από δείγματα (κλινικά και περιβαλλοντικά) είναι δυνατή η ανίχνευση **επτά** σημαντικών αλληλομόρφων των γονιδίων, που είναι τα: ***flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *tompS*, *proA*, και *neuA***, μέσω PCR και τα θετικά προϊόντα της, υπόκεινται σε διαδικασία αλληλούχισης.
- Μέσω του προφίλ των αλληλίων που θα προκύψουν από την τράπεζα δεδομένων του ESGLI, προσδίδεται σε κάθε στέλεχος *L. pneumophila* ένας ειδικός τύπος στελέχους, ο **ST (Sequence Type)**. Αν ο ST ενός στελέχους που απομονώθηκε από κλινικό δείγμα, είναι ο ίδιος με το στέλεχος που απομονώθηκε από το αντίστοιχο περιβαλλοντικό «ύποπτο» δείγμα, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι βρέθηκε η πηγή της λοίμωξης.
- Σε περίπτωση που δεν είναι δυνατή η απομόνωση του βακτηρίου από κλινικά δείγματα ασθενών με επιβεβαιωμένη λεγιονέλλωση, μπορεί να εφαρμοσθεί απευθείας το πρωτόκολλο **Nested-PCR-based SBT (NPSBT)**.

Διερεύνηση λοιμώξεων από *Legionella* spp.

- Άλλες μοριακές τεχνικές που έχουν εφαρμοσθεί είναι η **amplified fragment length polymorphism-AFLP** και η **pulse field gel electrophoresis-PFGE**.
- Η **AFLP** ήταν η **πρώτη** διεθνώς προτυποποιημένη, μέσω τυποποίησης γενετικού υλικού, μέθοδος που αναπτύχθηκε για την *L. pneumophila*.
- Οι παραπάνω τεχνικές, χρησιμοποιούνται για **όλα τα είδη *Legionella*** και η βασική τους αρχή περιλαμβάνει την χρήση περιοριστικών ενζύμων που τέμνουν το γενετικό υλικό σε μικρότερα κλάσματα διαφορετικού μοριακού βάρους, ώστε στην ηλεκτροφόρηση να παρέχεται ένα μοναδικό για κάθε στέλεχος, αποτύπωμα.

Διερεύνηση λοιμώξεων από *Legionella* spp.

Πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί και άλλες τεχνικές, όπως η:

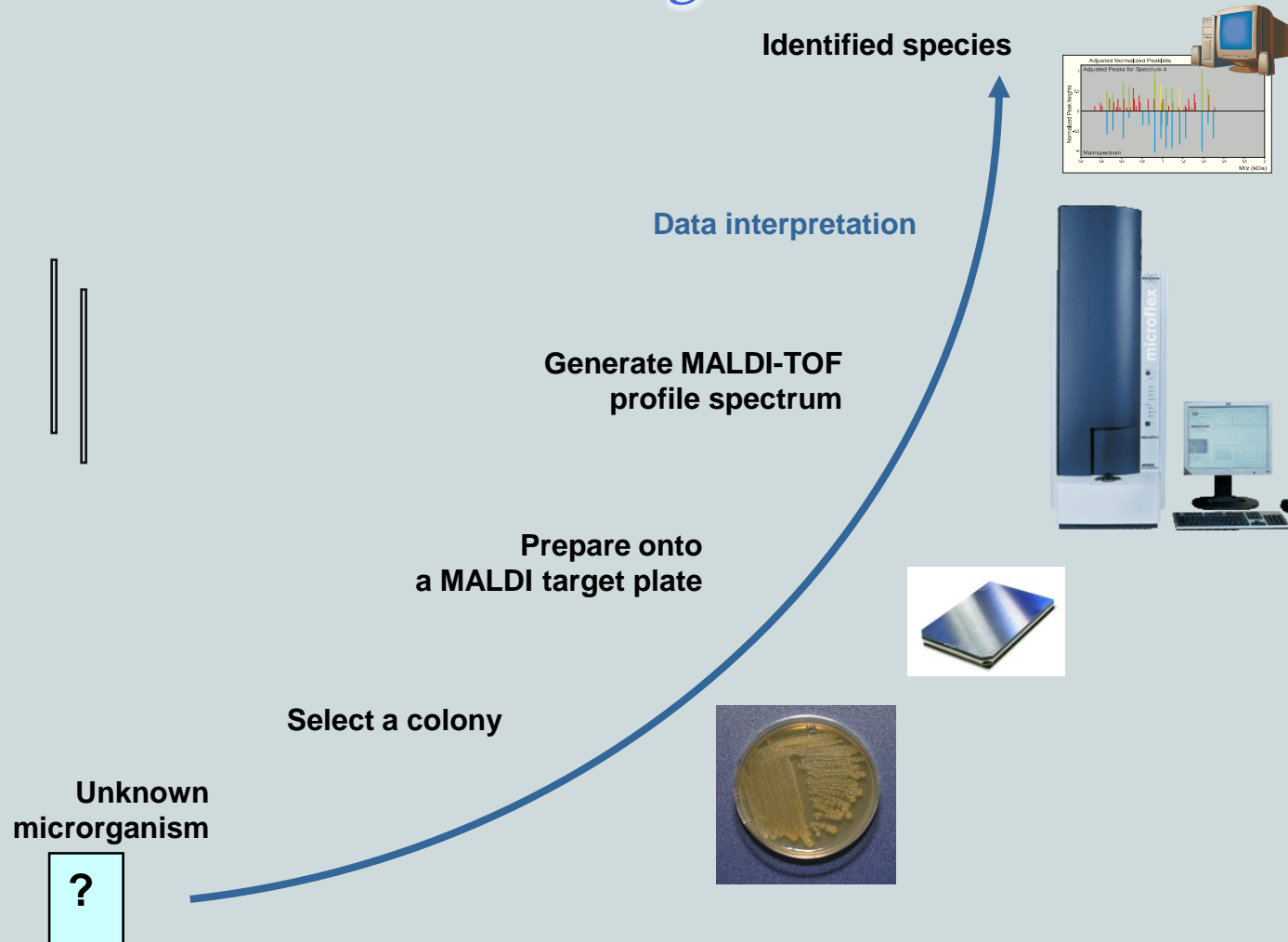
- **Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (Maldi Toff)**

Η τεχνική Maldi-Toff θεωρείται μια νέα μέθοδος τυποποίησης για την *Legionella*. Ακολουθεί την μεθοδολογία φασματομετρίας μάζας και είναι μια ταχεία και αποδοτική διαδικασία.

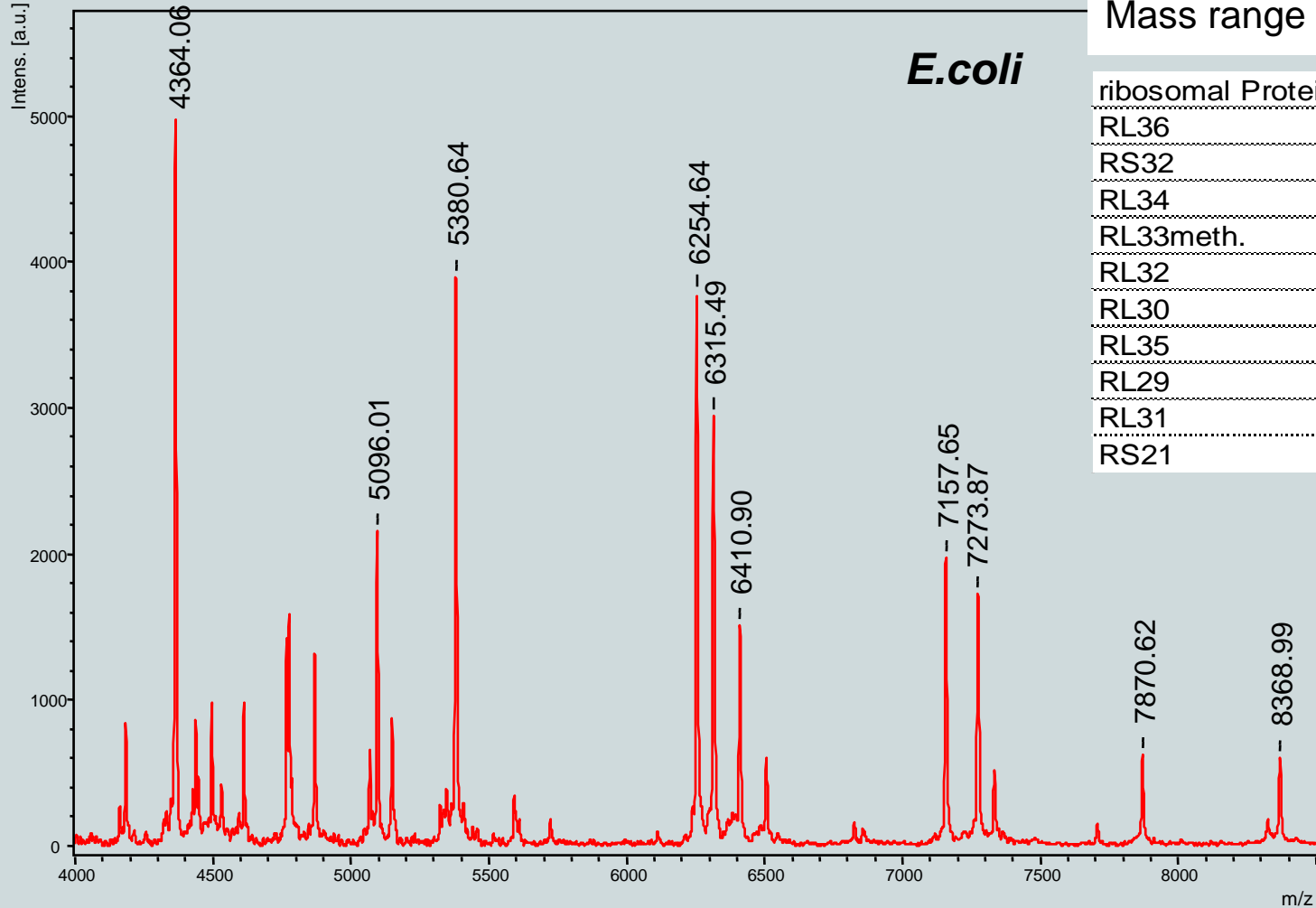
- **Rapid Whole Genome Sequencing (WGS)**

Με την συνεχή ανάπτυξη της τεχνολογίας, είναι πλέον εφικτό να γίνει εξειδικευμένη ανάλυση και αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος ενός μικροβίου. Σύμφωνα με τους Reuter et al. 2013, η Rapid bacterial whole-genome sequencing (WGS) είναι μια αναδυόμενη τεχνική που έχει την δυνατότητα να διακρίνει ταχέως απομονωθέντα στελέχη σχετιζόμενα με επιδημίες και μη, σε κλινικά συσχετιζόμενο χρονικό πλαίσιο. Τα μέχρι τώρα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά και θα μπορούσε στο μέλλον να αποτελέσει μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο.

MALDI-TOF MS microorganism identification



MALDI-TOF MS profile spectrum



Positive linear mode
Mass range 2-20 kDa

ribosomal Protein	m/z
RL36	4364,33
RS32	5095,82
RL34	5380,39
RL33meth.	6255,39
RL32	6315,19
RL30	6410,60
RL35	7157,74
RL29	7273,45
RL31	7871,06
RS21	8368,76

Eurosurveillance, Volume 11, Issue 34, 24 August 2006

Typing of *Legionella* isolates during an epidemiological investigation can be helpful but also misleading: an example from Greece

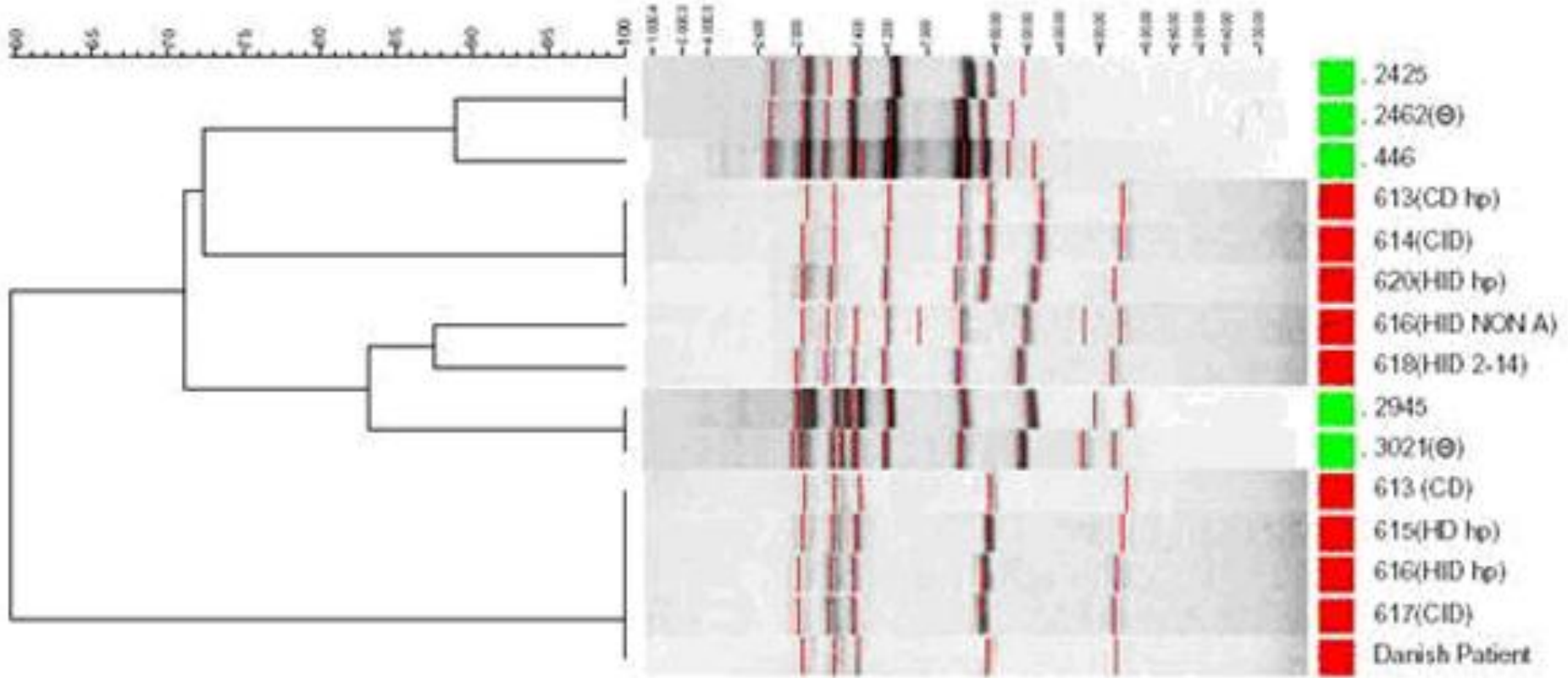
EN Velonakis¹, SA Uldum², P Giakoupi¹, S Loukoussias¹, SS Nielsen², G Spala³, A Vatoroulos¹

¹Department of Microbiology, National School of Public Health, Athens, Greece

²Department of Bacteriology, Mycology and Parasitology, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark

³Hellenic Centre for Disease Control and Prevention, Athens, Greece

- Διερεύνηση περιστατικού Νόσου των Λεγεωναρίων σε Δανό ασθενή που βρέθηκε στην Ελλάδα για διακοπές.
- Επιβεβαιώθηκε μέσω καλλιέργειας και επετεύχθη η επιδημιολογική συσχέτιση.
- Έγινε σύγκριση του γενετικού αποτυπώματος του στελέχους *L. pneumophila* serogroup 1, που απομονώθηκε από κλινικό δείγμα του ασθενούς στην Δανία και των στελεχών που απομονώθηκαν από περιβαλλοντικά δείγματα νερού του ξενοδοχείου στο οποίο διέμνηε στην Ελλάδα.



AFLP results and the respective dendrogram of the isolates tested, produced using Bionumerics software. Red bullets indicate the isolates involved in the investigation and green bullets indicate isolates from previously typed environmental (water) samples in the Greek databank, unrelated to the incident (See table for strain designation). The clinical isolate was found to belong to serogroup 1, the Benidorm subgroup and the AFLP type 1, which supported the initial epidemiological link of the patient to the hotel.

Eurosurveillance, Volume 14, Issue 2, 15 January 2009

Rapid communications

**LEGIONNAIRES' DISEASE IN A NEONATAL UNIT OF A PRIVATE HOSPITAL,
CYPRUS, DECEMBER 2008: PRELIMINARY OUTBREAK REPORT**

Unit for Surveillance and Control of Communicable Diseases

Medical and Public Health Services, Ministry of Health, Nicosia, Cyprus

We report an outbreak of Legionnaires' disease in neonates, affecting 11 newborn babies. The case fatality rate is currently 27%. The outbreak has been confirmed by detection of *Legionella pneumophila* antigen in eight of the 11 cases. Tests are in progress to determine the source of infection.

Results obtained by culture and isolation of the clinical samples submitted.

clinical samples:											
No	Patn	Your ref.	Our ref.	Date of Sample	Spec.	DIF	No. of cols examined	serology	mAb	ST	Comment
1	b/o PS	M30	H09720308	02/01/2009	BAL	Pos	5	<i>L.pneumophila</i> serogroup 3	Dres Sgp 3 mAb+ve	ST93	single colony confirmed by mAb and ST
2	KP	M31	H09720309	02/01/2009	BAL	Pos	5	<i>L.pneumophila</i> serogroup 3	Dres Sgp 3 mAb+ve	ST93	single colony confirmed by mAb and ST
3	AC	M32	H09720314	02/01/2009	BAL	Pos	1	<i>L.pneumophila</i> serogroup 3	negative with all Dres mAbs	ST93	single colony recovered
4	KP	M66	H09720329	04/01/2009	BAL	Pos	2	<i>L.pneumophila</i> serogroup 3	Dres Sgp 3 mAb+ve	ST93	single colony confirmed by mAb and ST
5	b/o PS	M67	H09720332	04/01/2009	BAL	Pos	5	<i>L.pneumophila</i> serogroup 3	Dres Sgp 3 mAb+ve	ST93	single colony confirmed by mAb and ST
6	KP	M80	H09720344	04/01/2009	BAL	Pos	5	<i>L.pneumophila</i> serogroup 3	Dres Sgp 3 mAb+ve	ST93	single colony confirmed by mAb and ST
1	b/o PS	M125	H09720345	04/01/2009	lung biopsy	Pos	5	4 col. = <i>L.pneumophila</i> serogroup 3	Dres Sgp 3 mAb+ve	ST93	single colony confirmed by mAb and ST
								1 col. = <i>L.pneumophila</i> serogroup 1	Oxford/OLDA	ST1	

Notes: Samples were examined by direct immunofluorescence using an *Legionella pneumophila* specific, FITC conjugated monoclonal antibody (BioRad). Five colonies recovered from each sample were examined (or all colonies recovered if less than five) using RSIL rabbit hyperimmune antisera. A single colony of each 'phenotype' from each sample was then confirmed using the Dresden panel of monoclonal antibodies and the genotype of this isolate was determined using the standard EWGLI SBT method.