

LEGIONELLA: COS'E' E COME FARE PREVENZIONE

*Seminario informativo per i gestori di
strutture turistico-ricettive*

*Mercoledì 20 novembre 2019 - Ore 14.30
Pépinrière d'Entreprises, Aosta*

CHI SONO

Maria Francesca Borney

- ✓ Laboratorio Microbiologia
ARPA VdA
- ✓ Analisi microbiologiche su
varie matrici (alimenti, acque,
rifiuti)
- ✓ Analisi biologiche ed
ecotossicologiche



Riferimenti normativi

Linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi

ALLEGATO 8: ELENCO DEI LABORATORI REGIONALI DI RIFERIMENTO PER LA LEGIONELLOSI

A. Laboratori di riferimento per la diagnosi ambientale



VALLE D'AOSTA
ARPA Valle d' Aosta -Lab. Microbiologia
Dott.ssa M. Francesca Borney

«Linee guida recanti indicazioni ai laboratori con attività di diagnosi microbiologica e controllo ambientale della legionellosi».

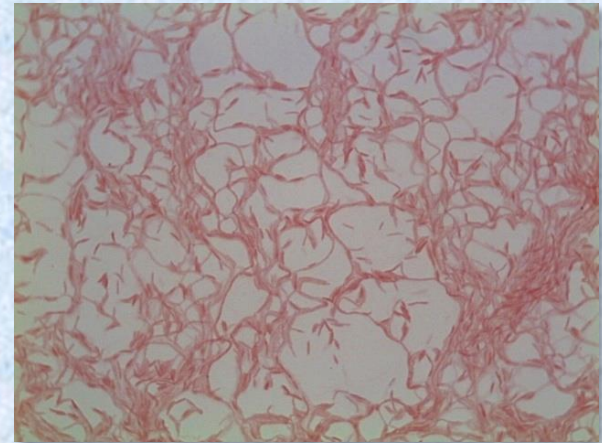
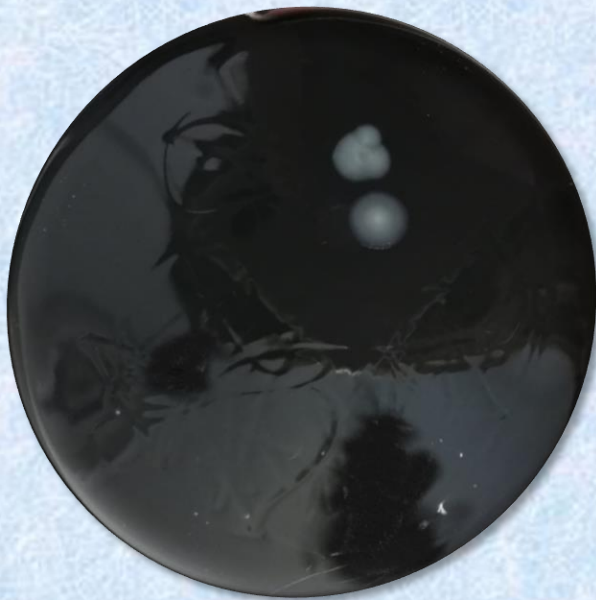
Accordo tra il Ministero della salute e i presidenti delle regioni e delle province autonome, ai sensi dell'articolo 4 del decreto legislativo 28 agosto 1997, n. 281, (GU Serie Generale n.29 del 05-02-2005)

COSA VOGLIO DIRE

- ✓ **Cos'è** la *Legionella* e dove si trova
- ✓ **Come si trasmette** e come si può contrarre la malattia
- ✓ **Come si rileva** nei campioni ambientali
- ✓ **Perché** ci possono essere delle **differenze** tra i **risultati analitici** di diversi laboratori su campioni prelevati nello stesso punto
- ✓ Metodo analitico **molecolare** vs **colturale** classico

COS'È LA LEGIONELLA E DOVE SI TROVA

Legionella è un piccolo **bacillo Gram-negativo, aerobio obbligato**, a **crescita lenta** e con precise **esigenze nutrizionali** (L- cisteina; ferro III). Optimum di temperatura tra 20°C e 42°C.



Si ritrova ubiquitariamente negli **habitat acquatici**, dove cresce nei **biofilm** naturali, sopravvive e si moltiplica come **parassita intracellulare** in vari tipi di protozoi, principalmente **amebe** (come *Acanthamoeba*, *Hartmannella* e *Naegleria*), ma anche in altri microrganismi come alcuni tipi di muffe.



Il genere *Legionella* è composto da almeno **61 specie** e numerosi sierogruppi (26 specie isolate in casi di infezione polmonare).

La maggior parte delle infezioni umane è causata da ***L. pneumophila* sierogruppo 1** (*L. pneumophila* composta da almeno 15 sierogruppi).



In Europa, circa il **70%** delle infezioni da *Legionella* è causato da *L. pneumophila* di sierogruppo 1



Il **20-30%** è causato da altri sierogruppi di *L. pneumophila*

Il **5-10%** è causato da specie di *Legionella* non *pneumophila*



Legionellosi in Europa

soggetta a notifica in tutti i 31 Paesi EU/EEA

70%

acquisita in comunità

20%

associata ai viaggi

10%

associata a cure sanitarie

Legionellosi professionale

dal 1978 al 2016

62%

ambienti industriali (impianti di produzione di energia elettrica, trivellazioni petrolifere e produzione automobilistica)

27,3%

edifici per uffici

6,3%

strutture sanitarie

casi
sporadici

Altri luoghi di lavoro, come lo scavo artesiano, i siti orticoli e la rete fognaria

Le fonti più diffuse di infezione sempre correlate a fonti idriche scarsamente o non correttamente mantenute



Legionella pneumophila è nota come agente causale

Malattia dei
legionari

Febbre di
Pontiac

Il **meccanismo di patogenesi** è legato alla sua capacità di **replicarsi** nei **macrofagi** alveolari umani



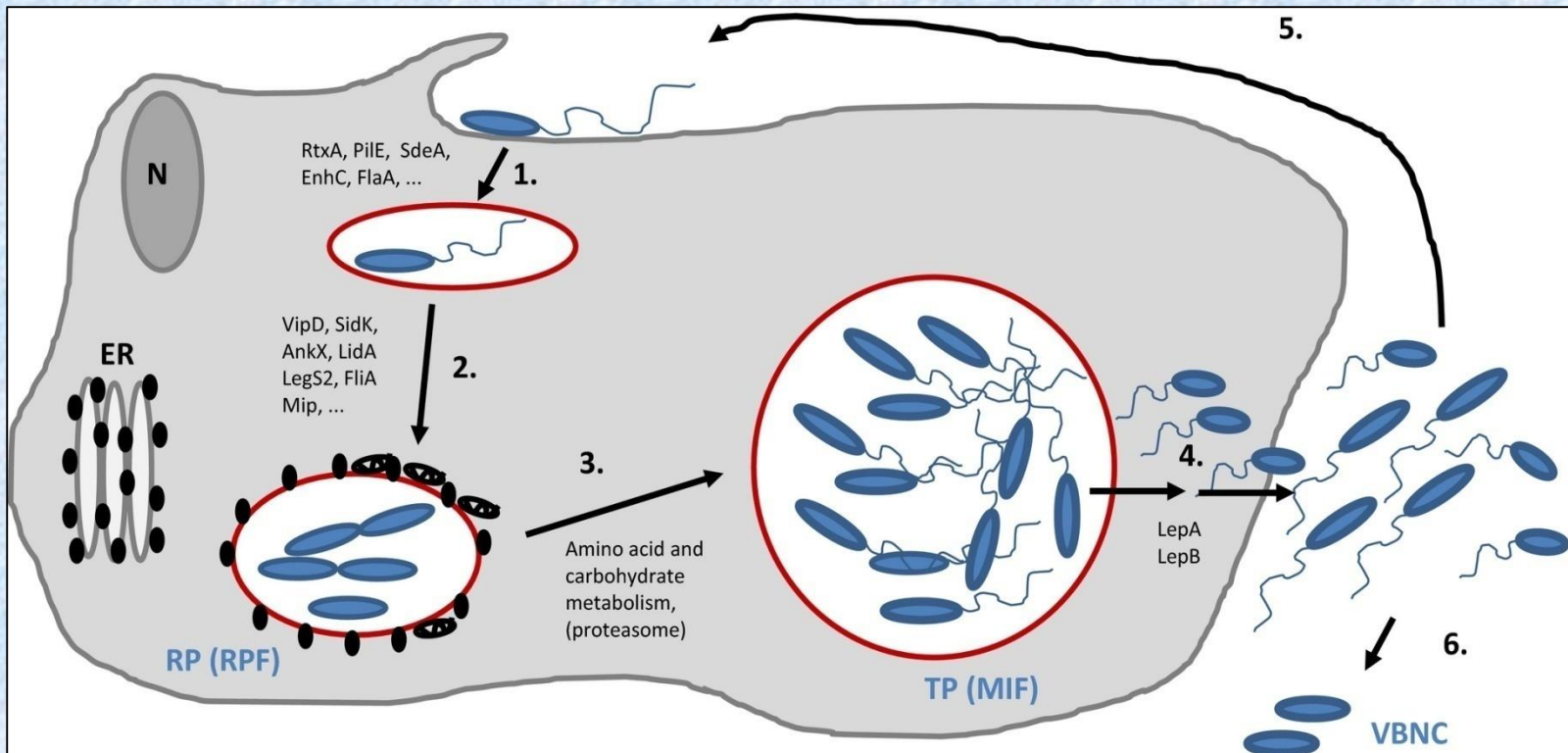
infiammazione del polmone e polmonite

Fasi di crescita **intra** e **extracellulari**

Due fasi di crescita

Fase **mobile**
non replicativa

Fase replicativa
non mobile



Dopo la replicazione *L. pneumophila* viene rilasciata dalla cellula ospite



È in grado di infettare altre cellule

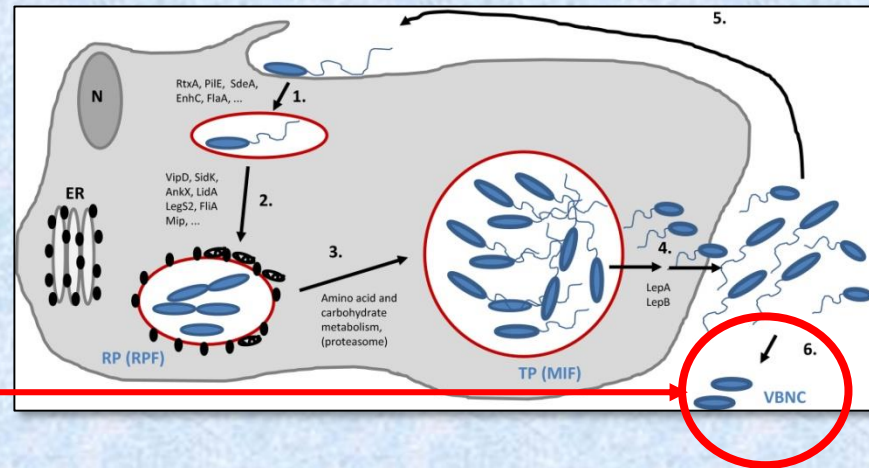
Soggiorno prolungato in acqua



stato vitale ma non coltivabile (VBNC)



la sua presenza non è rilevabile con i metodi colturali classici



Una buona conoscenza dei fattori che influenzano la **sopravvivenza** e la **crescita** della *Legionella* nell'ambiente naturale

Permette nei sistemi
idrici artificiali di



Rilevare **aree** maggiormente
a rischio di colonizzazione

Individuare **punti** in cui le
misure di **controllo** saranno
più efficaci

controllo della **presenza** e
della **proliferazione** dei batteri

Ubiquitarie negli ambienti acquatici naturali e artificiali

Sono state ritrovate anche nell'acqua residua sulle piante nelle foreste pluviali, nelle acque sotterranee e nell'acqua di mare



Resistenti

→ **acido** (pH 2.0
per brevi periodi)

→ **temperature** estreme
(molto basse o molto
alte fino 66°C)

Riprende a moltiplicarsi quando le condizioni ambientali ritornano ad essere favorevoli.

In alcuni **ambienti** acquatici **naturali** la *Legionella* può essere presente in **concentrazioni** troppo **basse** per essere rilevata usando metodi di coltura

In basso numero si trova nelle **fonti** di **approvvigionamento** e **distribuzione** di **acqua potabile**



Sistemi idrici
all'interno di **edifici** e
torri di raffreddamento



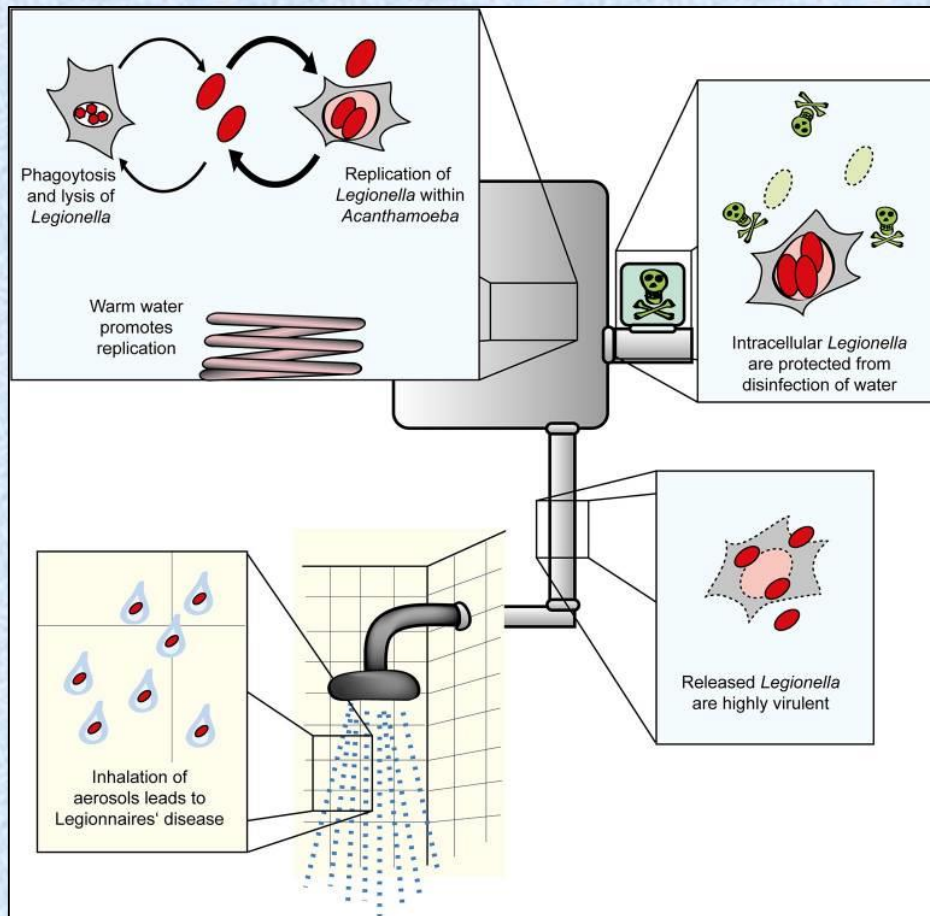
condizioni chimico fisiche che **favoriscono la crescita** (in particolare a temperature comprese tra 20 °C e 42 °C)



Possibilità di rilevare la *Legionella* in numero molto più elevato

Protozoi

vettore importante per la **sopravvivenza** e la **crescita** della *Legionella* sia in natura e che negli ambienti artificiali



Protezione

biocidi

effetti termici di disinfezione

Moltiplicazione e disseminazione

Può essere un meccanismo attraverso il quale *L. pneumophila* è in grado di sopravvivere a **condizioni ambientali avverse** e sopravvivere in **aerosol dispersi** nell'aria (cisti di amebe)

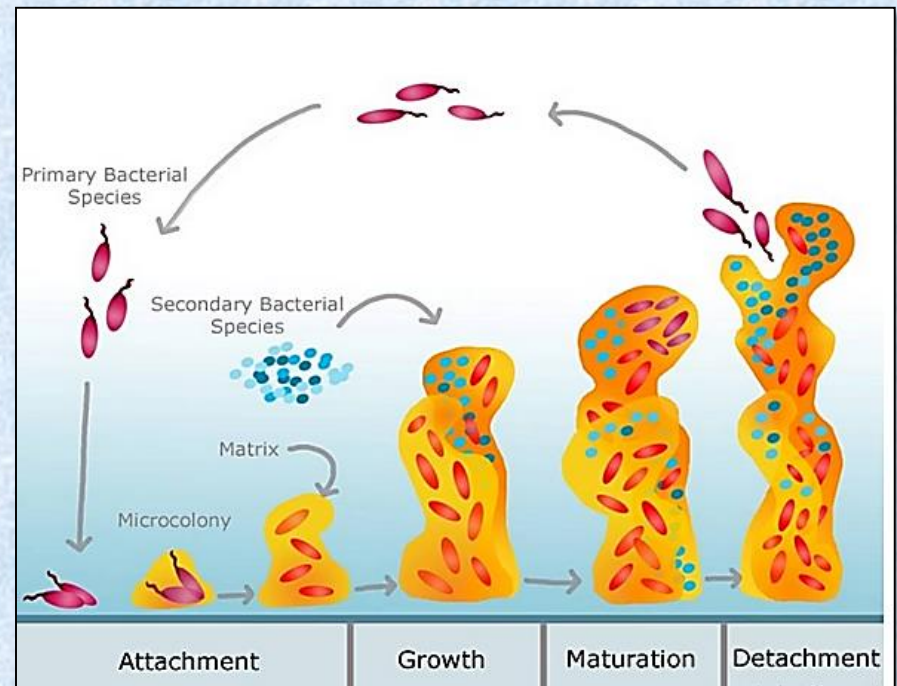
Biofilm



importante per la sopravvivenza e la crescita di *Legionella* nei sistemi idrici

Fattori che aumentano la probabilità di **formazione** di biofilm:

- ✓ presenza di **nutrienti** nell'acqua e nei materiali del sistema di distribuzione
- ✓ punti di **discontinuità** e **corrosione** delle tubature
- ✓ **temperatura** dell'acqua (sopra i 20 °C)
- ✓ **ristagno** o basso flusso (punti morti delle tubazioni del sistema di distribuzione e in serbatoi di stoccaggio)



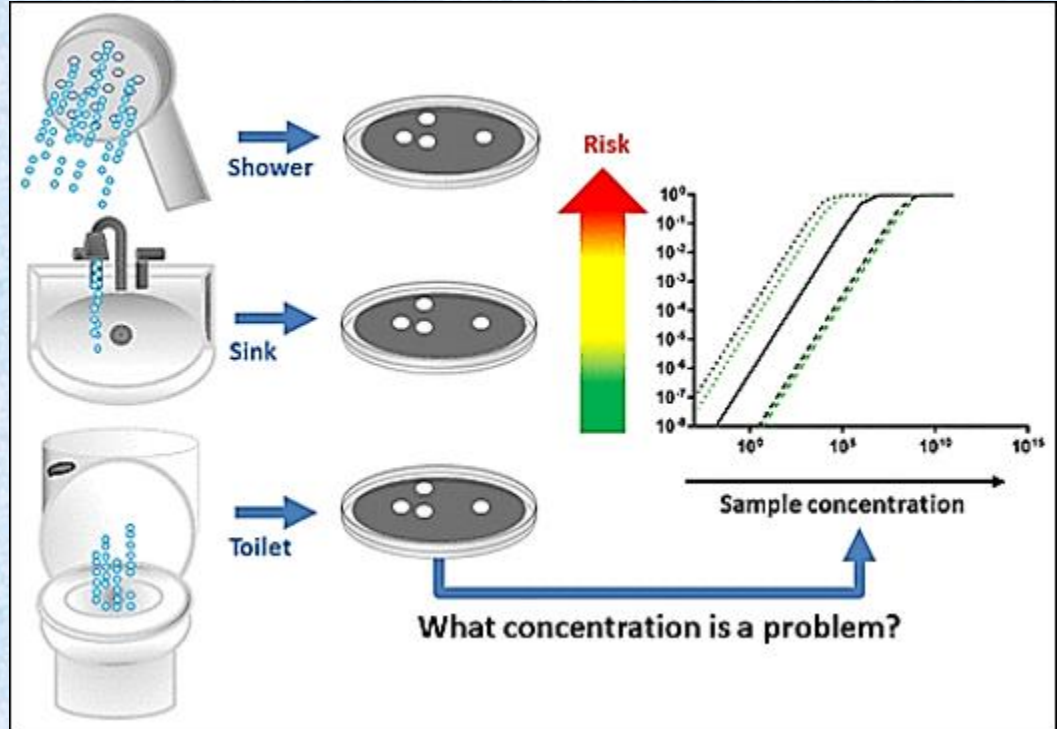
COME SI TRASMETTE E COME SI PUO' CONTRARRE LA MALATTIA

Per contrarre l'infezione *L. pneumophila* deve essere **inalata** e **depositata** negli **alveoli** dei polmoni

Legionellosi

⇒ Forma più grave (la malattia dei legionari)

⇒ Forma meno grave (la febbre di Pontiac)



Fonte infetta (es. fontana) può diffondere spray o goccioline d'acqua (aerosol) contenenti *Legionella*



la maggior parte o tutta l'acqua nella gocciolina evapora rapidamente



rilascia nell'aria **particelle** abbastanza **piccole** ($< 5 \mu\text{m}$) da essere inalate ed entrare nelle vie respiratorie per causare legionellosi

- Infezioni da *Legionella* associate a fonti a distanze fino a 3,2 km
- Evidenze recenti suggeriscono che l'infezione può essere possibile anche a distanze più lunghe
- Ceppi più virulenti sopravvivono più a lungo rispetto ai loro omologhi meno virulenti

Normalmente la trasmissione della malattia non avviene da persona a persona, tuttavia è stato riportato recentemente un possibile caso di trasmissione inter-umana.

prese
d'acqua

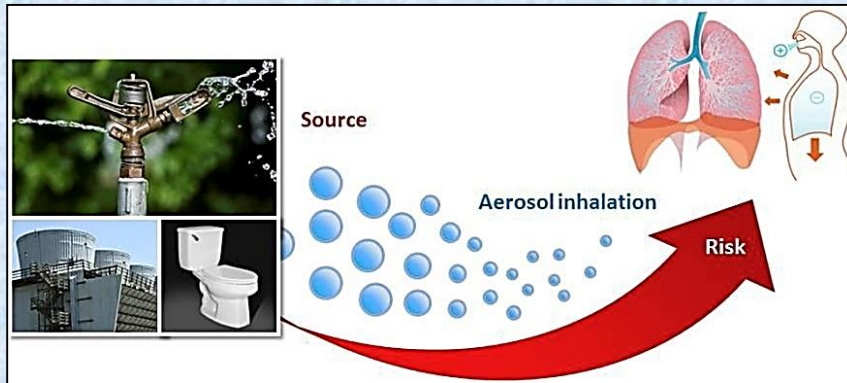
forniture
idriche

Batteri trasmessi principalmente
per inalazione di aerosol infettivi

torri di raffreddamento

vasche
idromassaggio

terme



Dopo l'inalazione e l'entrata
nel polmone, *L. pneumophila*
viene fagocitata dai
macrofagi alveolari

anziani

persone con malattie
polmonari croniche

maggiore suscettibilità alla
malattia dei legionari

uomini

fumatori

persone
immunodepresse

Legionella entra nel **polmone** della persona infettata (per aerosol o per aspirazione)

ceppi **non virulenti**



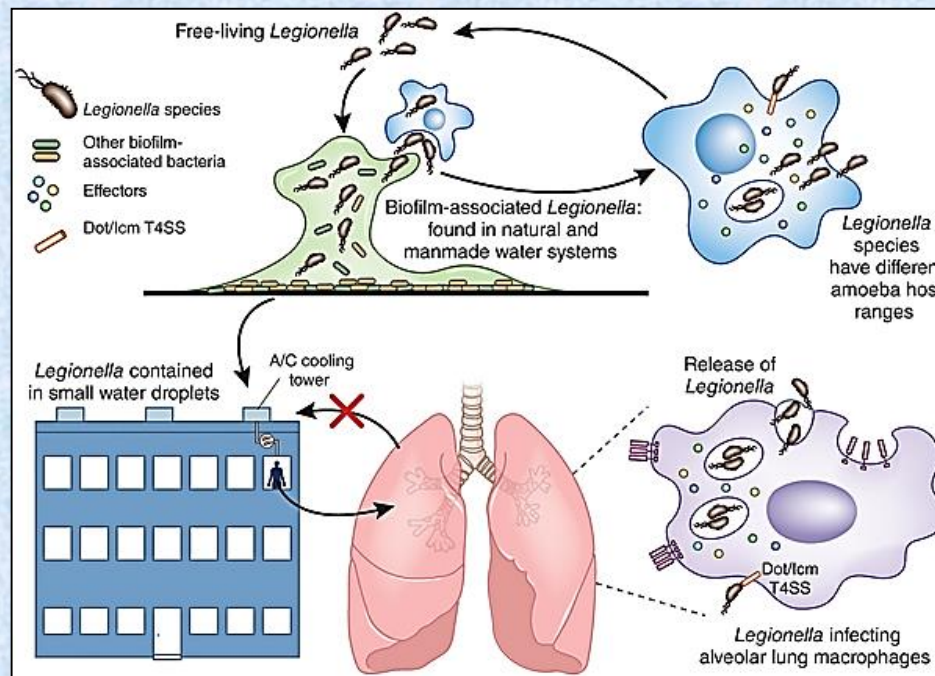
fagocitata dai macrofagi alveolari rimane intatta all'interno dei fagociti



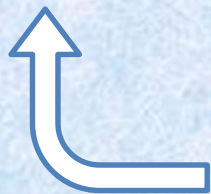
ceppi **virulenti**



possono moltiplicarsi all'interno dei fagociti e **inibire** la fusione dei fagosomi con i lisosomi



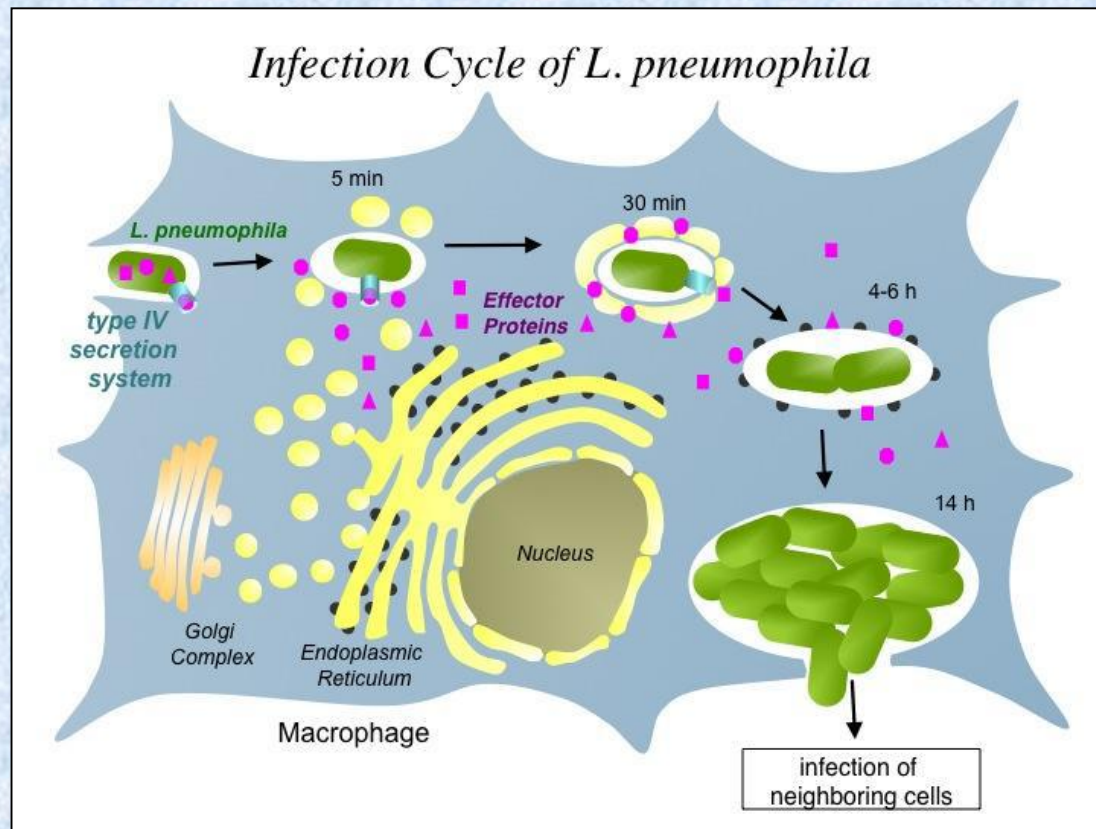
I batteri possono quindi **infettare** altri macrofagi, **amplificando** così la loro concentrazione all'interno dei polmoni



morte del macrofago e rilascio di un gran numero di batteri



I ceppi **virulenti** di *Legionella* quindi impediscono l'attività battericida del fagocita e lo trasformano in una **nicchia** per la loro **replicazione e disseminazione**



COME SI RILEVA NEI CAMPIONI AMBIENTALI

Campioni di aria



Acqua



Dispositivi di erogazione



Biofilm



Punti fondamentali per ottenere un risultato analitico attendibile e comprensibile

➤ Procedura di campionamento



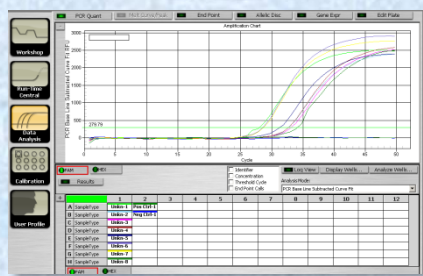
➤ Analisi del campione



➤ Refertazione del risultato

Sup.	Prova	Unità di misura	Risultato	Incertezza assoluta	Limite accettato	LOD Metodo
	Conte di Legionella spp.	u.c.f.u	100000		100 - 100 17/01/2017	
	Reserva di Legionella pneumophila		Negativa		100/100 17/01/2017	

➤ Interpretazione del risultato



NOTE GENERALI:
 - Il campionamento è quello effettuato dal Servizio di Prova, si segnala che parte dai dettagli necessari alla completa identificazione e caratterizzazione previsti dalla UNI EN ISO 17125:2017, sono riportati sul verbale di prova.
 - Il laboratorio opera in conformità ai requisiti della norma UNI EN ISO/IEC 17025:2018 come riconosciuto dal certificato di accreditamento numero conferenziale n° 1019 della norma UNI EN ISO 15189:2013 come attestato dal certificato ISO numero 0301/2018.
 - Le prove contrassegnate dal simbolo * non rientrano nello scopo dell'accreditamento così come il campionamento, le spedizioni, le identificazioni, la gestione e la responsabilità di tutte le informazioni presentate in questo rapporto di prova e delle altre parti responsabili per la parte finale di accreditazione riportate nelle sezioni "determinazione campionamento" e "nel verbale allegato".
 - Quando il parametro non viene rilevato nel campione, il risultato è espresso nella forma "inferiore a 1" e il valore indica il limite di determinazione.
 - La incertezza di misura, quando dichiarata, viene calcolata ad un livello di confidenza del 95% (metodo di copertura k=2) e viene espressa con la lettera G e la data di inizio e di fine prova comprendendo l'intero del risultato, dell'incertezza e di verifica dei risultati.
 - Il presente rapporto di prova non deve essere riprodotto parzialmente o non previa approvazione scritta da parte di questo laboratorio.
 - Il laboratorio, salvo diverse disposizioni di legge o del committente, conserva il campione analizzato per un periodo di 5 giorni a partire dalla data di conclusione.

Campionamenti effettuati su una **stessa matrice**, ma con **modalità diverse** possono produrre esiti analitici diversi

Metodo di riferimento per il campionamento (ISO 19458:2006) prevede procedure diverse

Quale **matrice**?

A quale **scopo**?

Es.: acqua della rete di distribuzione idrica

qualità dell'acqua all'interno della rete di distribuzione

qualità dell'acqua così come è utilizzata dal consumatore

Table 1 — Sampling at a tap for different purposes

Purpose (see above)	Water type	Remove attached devices and inserts	Disinfect	Flush
a)	In the distribution main	Yes	Yes	Yes
b)	As it is delivered to the tap	Yes	Yes	No ^a (minimal)
c)	As it is consumed	No	No	No

^a Flush briefly only to overcome influence of disinfection of the tap.

Campionamento

comprensivo delle modalità di **trasporto** e **conservazione** del campione prima dell'analisi (tempi e temperature)

ISO 19458:226	Maximum sample storage time (h) including transport		Storage water temperature (°C)	
	R	A	R	A
Legionella spp.	24		5±3	Ambient

Procedura analitica

Il metodo di riferimento è il metodo colturale ISO 11731:2017

Step 1		
Water or water derived from water related matrices e.g. swabs, biofilm, sediments		
Matrix A	Matrix B	Matrix C
Water with low background (see B.4.2 and B.4.3) e.g. potable water	Water with high background (see B.4.4) e.g. cooling tower, process water, water from air washers chambers, water from dental units	Water with extremely high background ^b (see B.4.5) e.g. waste water, surface water

A seconda della **matrice** analizzata e del **grado** di **contaminazione** atteso

Step 4																	
Culture media																	
Step 2			Step 3			Procedura			A			B			C		

3 tipologie di terreno colturale

Direct plating	Without treatment	1	R	R	O				O	R						
	Heat treatment	2	O	O	O				O	R						
	Acid treatment	3	O	O	O				O	R						
	Combination of heat/acid treatment	4							O	O			O	R		
Membrane filter on plate	Without treatment	5	R	O	O											
	Heat treatment	6	O	O	O				O	O						
	Acid treatment	7	O	R ^b					O	O						
Filtration with washing procedure	Without treatment	8	R	R ^b					O	R						
	Heat treatment	9	R	R ^b					O	R						
	Acid treatment	10	R	R ^b					O	R						
Plating after dilution	Without treatment	11	O ^c	O ^c	O ^c				O ^c	R ^c						
	Heat treatment	12	O ^c	O ^c	O ^c				O ^c	R ^c						
	Acid treatment	13	O ^c	O ^c	O ^c				O ^c	R ^c						
	Combination of heat/acid treatment	14							O ^d	O ^d			O ^d	R ^d		

14 procedure

oltre **60** risultati analitici differenti caratterizzati da diversa sensibilità e diverso limite di determinazione

ISO 11731:2017 - Figure J.1 - Decision matrix

Legionella cresce solo su terreni arricchiti con vari nutrienti e integrati con diverse combinazioni di agenti selettivi (BCYE, BCYE +AB, GVPC, MWY)

Ha una **crescita lenta** → **altri batteri eterotrofi** possono interferire → necessario **ridurre** la vitalità

Pretrattamento dei campioni con acido e/o calore (*Legionella* più resistente allo stress)



Possibilità di **sottostimare** il numero effettivo di Legionelle presenti nel campione

Alcune specie di *Legionella* non possono essere coltivate su terreni di coltura utilizzati di routine in questa analisi



sottostima della reale presenza di *Legionella* nel campione

Ad oggi, **non** è stata **stabilita** alcuna **relazione** diretta tra il **rischio** di infezione e il **numero** di Legionelle rilevate in un sistema idrico utilizzando il metodo colturale (ISO 11731)

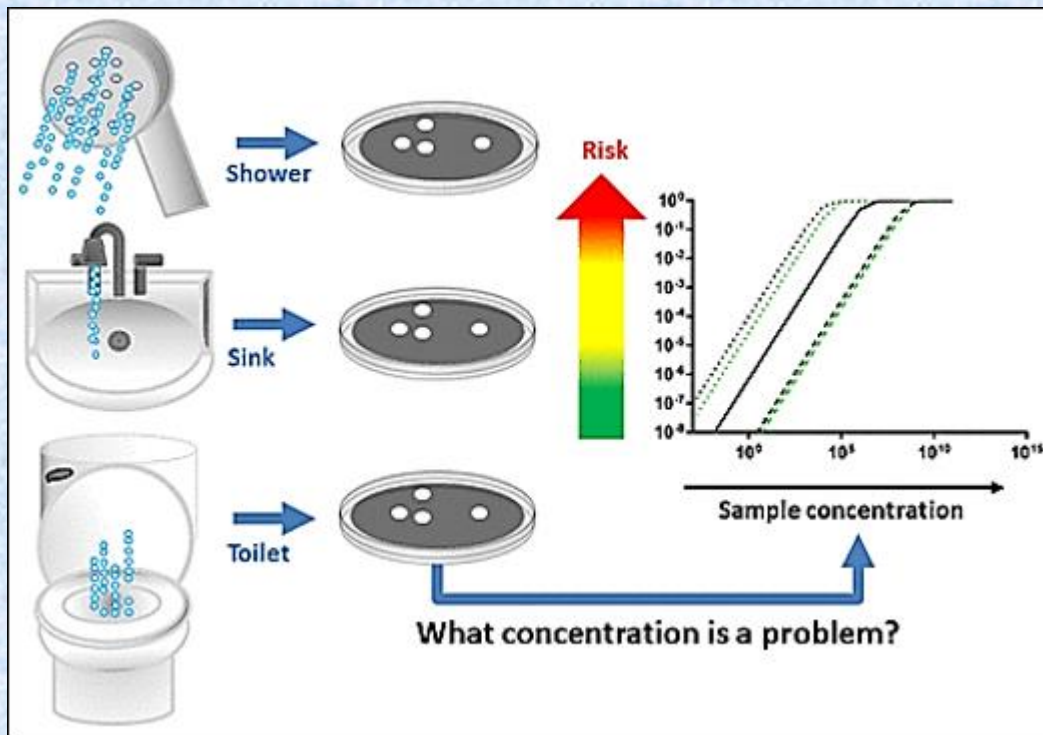
Alcune cause dello scarso recupero di *L. pneumophila* del metodo colturale

- **Pretrattamento** del campione con acido o calore
- Aggiunta di **antibiotici** nel terreno colturale
- Il **disinfettante residuo** nel sistema idrico
- Alcune **specie** che causano malattie (come *L. bozemanii* e *L. micdadei*) spesso non sono **rilevabili**
- Presenza di batteri **interferenti** o di altre specie di *Legionella* non patogene, che possono **inibire** o **mascherare** la crescita delle specie patogene

Malgrado le criticità e incertezze relative al metodo analitico colturale

i **risultati** analitici ottenuti (u.f.c./l), insieme alla **percentuale** di campioni contenenti *Legionella*, forniscono **informazioni** utili sul **grado di contaminazione** di un sistema idrico

Un elevato grado di contaminazione determina un'esposizione più elevata, che può portare a un rischio di infezione più elevato



I risultati analitici (autocontrolli e/o controlli ufficiali) devono essere interpretati in base alle indicazioni delle "Linee guida per la prevenzione della legionellosi " 2015

Tabella 6. Tipi di intervento indicati per concentrazione di *Legionella* (UFC/L) negli impianti idrici a rischio legionellosi esercitati in tutti i siti.

Legionella (UFC/L)	Intervento richiesto
Sino a 100	Verificare che le correnti pratiche di controllo del rischio siano correttamente applicate.
Tra 101 e 1.000	<p>In assenza di casi: Verificare che la struttura abbia effettuato una valutazione del rischio e che le misure di controllo elencate nelle presenti linee guida siano correttamente applicate.</p> <p>In presenza di casi: Verificare che siano in atto le misure di controllo elencate nelle presenti linee guida, sottoporre a revisione la specifica valutazione del rischio e effettuare una disinfezione dell'impianto</p>
Tra 1001 e 10.000	<p>In assenza di casi: -Se meno del 20% dei campioni prelevati risulta positivo l'impianto idrico deve essere ricampionato, almeno dagli stessi erogatori risultati positivi, dopo aver verificato che le correnti pratiche di controllo del rischio siano correttamente applicate. Se il risultato viene confermato, si deve effettuare una revisione della valutazione del rischio, per identificare le necessarie ulteriori misure correttive. L'impianto idrico deve essere ricampionato, dopo l'applicazione delle misure correttive.</p> <p>-Se oltre il 20% dei campioni prelevati risultano positivi, è necessaria la disinfezione dell'impianto e deve essere effettuata una revisione della valutazione del rischio, per identificare le necessarie ulteriori misure correttive. L'impianto idrico deve essere ricampionato, almeno dagli stessi erogatori risultati positivi.</p> <p>In presenza di casi: A prescindere dal numero di campioni positivi, è necessario effettuare la disinfezione dell'impianto e una revisione della valutazione del rischio, per identificare le necessarie ulteriori misure correttive. L'impianto idrico deve essere ricampionato dopo la disinfezione, almeno dagli stessi erogatori risultati positivi</p>
Superiore a 10.000	Sia in presenza che in assenza di casi, l'impianto deve essere sottoposto a una disinfezione (sostituendo i terminali positivi) e a una revisione della valutazione del rischio. L'impianto idrico deve essere ricampionato, almeno dagli stessi erogatori risultati positivi.

Valori guida che indicano i livelli di azione



PERCHE' CI POSSONO ESSERE

DIFFERENZE TRA I RISULTATI ANALITICI DI DIVERSI LABORATORI

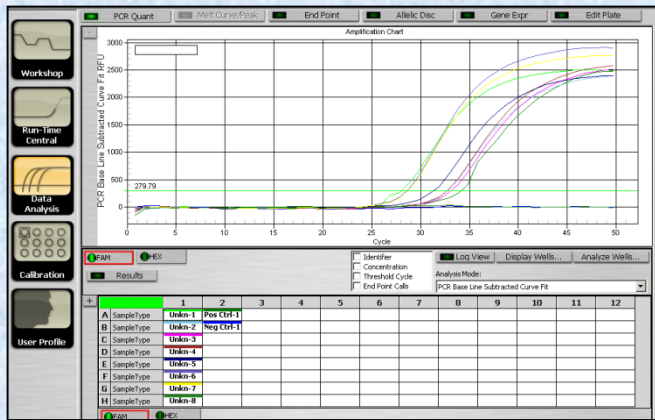
- Procedura di campionamento → utilizzo di **procedure** diverse, **trasporto** e **conservazione** del campione non corretti
- Analisi del campione → procedura **non adeguata**, limiti di rilevabilità non comparabili
- Refertazione del risultato → **non corretta** (ad es. non riporta tutte le informazioni necessarie per individuare la procedura di campionamento e la procedura analitica utilizzata)
- Interpretazione del risultato → **non corretta** (il risultato deve essere interpretato alla luce della procedura utilizzata e del relativo limite di rilevazione)

METODO ANALITICO MOLECOLARE VS CULTURALE CLASSICO

Metodo ISO/TS 12869:2012

- ➔ Concentrazione del campione per filtrazione
- ➔ Estrazione del DNA
- ➔ Rilevazione del DNA di *L. pneumophila* in tempo reale

Valore predittivo negativo del 100% può essere utilizzato come screening dei campioni negativi



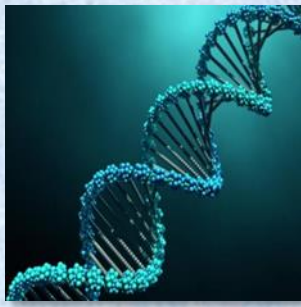
concentrazione di *Legionella* ↔ Ct =

Previsione del **livello di contaminazione** del campione

campioni di autocontrollo ➔

segnale che indica una contaminazione elevata ➔

azioni tempestive di sanificazione da intraprendere



Il risultato positivo (espresso in **U.G./L**) deve essere confermato dal metodo colturale (quando necessaria esatta quantificazione)

Rileva il **DNA** (cellule stressate e non vitali o cellule morte, cellule intra-ameba) Non influenzato dalla presenza di batteri interferenti

Metodo **veloce** (meno di 24 ore per un risultato)

Metodo poco operatore dipendente

Possibilità di analizzare molti campioni contemporaneamente



Metodo di riferimento in tutte le linee guida (risultati espressi in **UFC/L**)

Livelli di azione espressi in UFC/L

Rileva la presenza solo di **cellule** vitali e coltivabili (no intra-ameba). Influenzato dalla presenza di batteri interferenti.

Metodo molto **lungo** (10 giorni per un risultato definitivo)

Metodo complesso e laborioso fortemente operatore dipendente (microbiologo esperto)

BIBLIOGRAFIA

- Beauté, J. et al. “Factors associated with Legionnaires' disease recurrence in hotel and holiday rental accommodation sites.” *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* vol. 24,20 (2019): 1800295. doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.20.1800295
- Boccia S. et al. “Confronto tra il metodo colturale standard e la real-time PCR per l’identificazione di Legionella pneumophila in campioni di acqua” *Igiene e sanità Pubblica* Volume LXXI – N. 6 – Novembre/Dicembre 2015 *IgSanPubbl* – Issn 0019-1639 (www.igienesanita.org)
- Correia A. M. et al., 2016 “Probable Person-to-Person Transmission of Legionnaires’ Disease” *N Engl J Med* 2016; 374:497-498 DOI: 10.1056/NEJMc1505356
- Eisenreich W., Heuner K. “The life stage-specific pathometabolism of Legionella pneumophila “ *FEBS Letters* 590(2016) 3868–3886 <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12326>
- Hamilton K. A. et al. “Risk-Based Critical Concentrations of Legionella pneumophila for Indoor Residential Water Uses” *Environ. Sci. Technol.* 2019, 53, 4528–4541
- Madera-García, Valerie et al. “*Legionella pneumophila* as a Health Hazard to Miners: A Pilot Study of Water Quality and QMRA.” *Water* vol. 11,8 (2019): 1528. doi:10.3390/w11081528
- Swart AL et al. *Acanthamoeba* and *Dictyostelium* as Cellular Models for *Legionella* Infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:61. Published 2018 Mar 2. doi:10.3389/fcimb.2018.00061
- “Legionella and the prevention of legionellosis” World Health Organizationn (WHO) 2007 ISBN 92 4 156297 8
- “Linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi” Conferenza Stato-Regioni del 7 maggio 2015
- ISO 11731:2017 “Water Quality – Enumeration of *Legionella*”
- ISO/TS 12869:2012 “Water Quality – Detection and quantification of *Legionella* spp and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)”
- ISO 19458:2006 ““Water Quality – Sampling for microbiological analysis”

The background of the image is a circular, close-up view of a white ceramic plate. The plate's surface is covered with a fine, repeating diamond-shaped pattern of small perforations. Numerous small, clear droplets of condensation are scattered across the plate, particularly concentrated in the center and lower half. The lighting is soft, highlighting the texture of the plate and the glistening of the water droplets.

**GRAZIE PER
L'ATTENZIONE**