

# **LABORATORIO DI RIFERIMENTO REGIONALE PER LA SORVEGLIANZA DI LEGIONELLA SPP.**

---

Regione Molise  
*Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale*  
*Dipartimento Provinciale di Isernia*



**A. Manuppella; G. Pellegrino**

*Pescara: 19 ottobre 2006*  
*Sala Convegni Aeroporto Internazionale D'Abruzzo*

**“Sorveglianza della contaminazione da *Legionella*  
nella Regione Molise”**



➤ Richiesta Ministero Salute (2001 – linee guida legionellosi viaggi)



**DIPARTIMENTO DI ISERNIA  
DELL'ARPA MOLISE**

➤ Delibera di Giunta Regionale n° 1077 del 15/07/2002



## Funzioni del Laboratorio

- **Intervento in caso di cluster o caso singolo;**
- **Partecipazione a circuiti di controllo di qualità (Water EQA HPA);**
- **Funzioni anche di laboratorio di base (solo campioni ambientali);**
- **Coordinamento con le Zone Territoriali della A.S.Re.M. per i piani di campionamento;**
- **Esecuzione delle indagini microbiologiche;**
- **Comunicazione tempestiva dei risultati delle indagini ai Dipartimenti di Prevenzione;**
- **Comunicazione dei risultati ed eventuale invio dei ceppi isolati al Laboratorio Nazionale di Riferimento dell'ISS.**



## INTERVENTI RICHIESTI

### Livello NAZIONALE

*Ministero della Salute* (casi singoli  
di malattia o cluster )



**ALBERGHI coinvolti**  
**MOTONAVI**

### Livello LOCALE

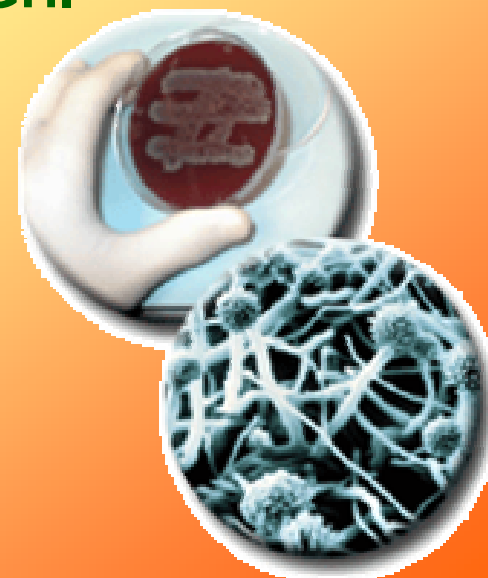
*ASReM*



**OSPEDALI/ CASE DI CURA**  
**CASE DI RIPOSO**  
**CASE CIRCONDARIALI**  
**ALBERGHI**

### LE SRUTTURE CONTROLLATE

**7 Alberghi**  
**3 Ospedali**  
**6 Case di riposo**  
**3 Motonavi**  
**1 Casa Circondariale**



## Richieste Ministero della Salute

✓ **Caso di legionellosi (periodo 2004):** soggetto che aveva soggiornato presso una Struttura Alberghiera Molisana

**CONTROLLO STRUTTURA  
MOLISANA**

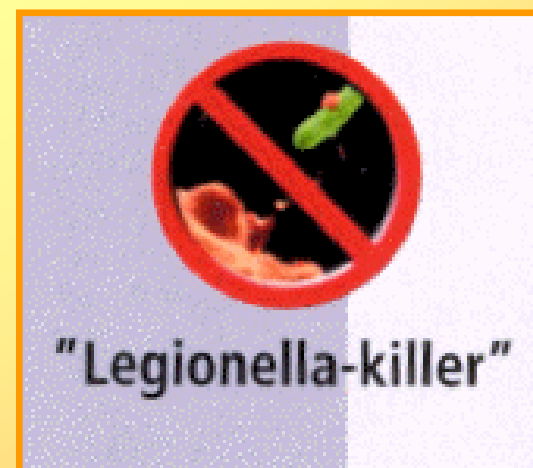
**100-550 UFC/L**

**L. Pneumophila sg. 3**



**CONTROLLO DOPO IPERCLORAZIONE**

**< 100 UFC/L**



✓ **Navi:** 2 casi di legionellosi (nel corso di 2 anni) a carico di ospiti di una nave-passeggeri greca (tragitto Ancona-Patrasso)

**CONTROLLO MOTONAVI MOLISANE**

## Siti di campionamento (1/3)

### Ospedali/Case di Cura:

#### Rete acqua fredda:

- Serbatoio acqua fredda;
- Punto più distale

#### Rete acqua calda:

- Serbatoio (presso valvole scarico);
- Ricircolo acqua calda;
- 1 camera ogni reparto (acqua e biofilm – docce e rubinetti)
- Acqua eventualmente contenuta nelle apparecchiature per la respirazione assistita (gorgogliatori ossigeno);
- Acqua torri raffreddamento;
- Acqua di condensa proveniente dalla superficie delle serpentine di raffreddamento dell'aria;



## Siti di campionamento (2/3)

### Alberghi



### Case di riposo



### Case circondariali



#### Rete acqua fredda:

- Serbatoio acqua fredda;
- Punto più distale;

#### Rete acqua calda:

- Serbatoio (presso valvole scarico);
- Ricircolo acqua calda;
- 1 camera ogni piano (acqua e biofilm, docce e rubinetti);



## Siti di campionamento (3/3)

### **Motonavi:**

- Serbatoio acqua fredda;
- Serbatoio acqua calda;
- 1 – 2 bagni ogni ponte (acqua e biofilm, rubinetti lavandini);
- Aria condizionata (1000L di aria direttamente su piastra)





## Modalità di campionamento



### Acqua: METODO UNICHIM N°1037/2002

- contenitori sterili in vetro pyrex da 1 L contenenti sodio tiosolfato
- prelievo senza flambatura e senza scorrimento dell'acqua (rilievo temperatura immediato e dopo 3 – 5 minuti)

### Biofilm: provette sterili con tampone



**ACQUA**

- Agitare il campione di acqua e trasferire 10 ml in busta sterile
- Filtrare il quantitativo rimanente e trasferire la membrana nel sacchetto con i 10 ml
- Stropicciare la membrana nel liquido; prelevare 0.1 ml e seminare su due piastre con la spatola (MWY)
- Preparare una diluizione 1/10 del TQ con acqua sterile e seminare due piastre con 0.1 ml
- Preparare una diluizione 1/2 del TQ con acido (e/o trattamento termico); lasciar riposare per 5 min e seminare 0.2ml
- Preparare una diluizione 1/10 della soluzione con acido e seminare 0.2 ml

**BIOFILM**

- I campioni vengono trattati allo stesso modo dei campioni di acqua, (non viene effettuata alcuna filtrazione)
- Prima di seminare il campione agitare bene il tampone nella provetta

## Procedura

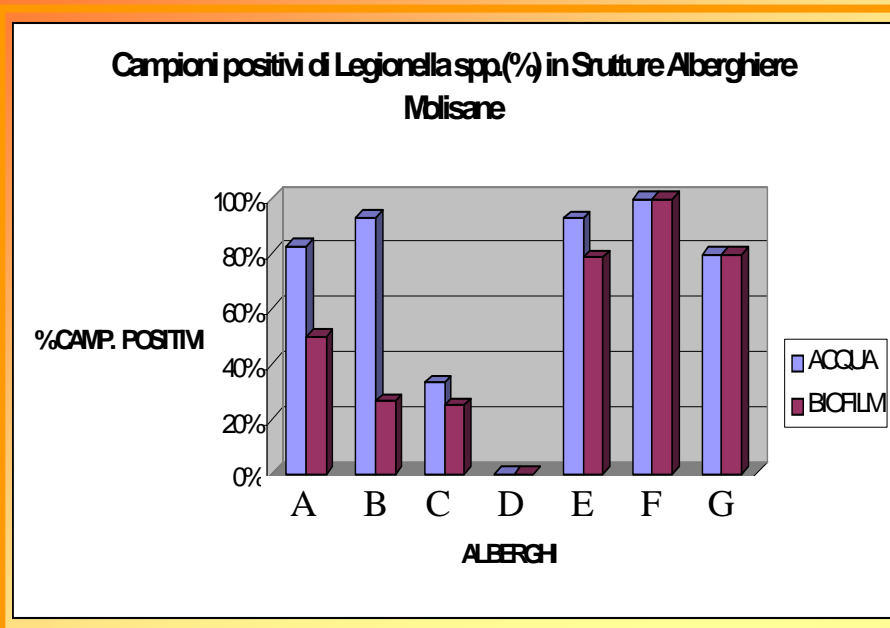
- Incubazione per 10 gg a 37°C in camera umida
- Lettura ad intervalli di 3 - 4 gg
- Passaggio di un numero significativo (10) di colonie contemporaneamente in Agar MWY ed in Agar senza Cisteina (ovvero Agar sangue o agar Brain Heart)
- Microagglutinazione al lattice delle colonie che non sono cresciute sull'agar senza Cisteina (individuazione di Leg. Spp., L. pneumophila 1 o L. pneumophila 2 – 14).



# Risultati

		ACQUA			BIOFILM			ARIA			TOT	
N°	STRUTTURE	N° CAMP.	CAMP. POS.	% CAMP. POS.	N° CAMP.	CAMP. POS.	% CAMP. POS.	N° CAMP.	CAMP. POS.	% CAMP. POS.	N° CAMP.	% CAMP. POS.
3	H	36	22	61.1%	29	14	48.3%	0	0	0	65	55.4%
6	CR	78	25	32%	68	17	25%	0	0	0	146	29%
7	ALB	93	63	67.8%	90	56	62.2%	0	0	0	183	65%
3	NAVI	13	6	46.1%	9	7	77.8%	2	0	0	24	54.2%
1	CC	12	4	33.3%	12	4	33.3%	0	0	0	24	33.3%
20		232	120	52%	208	98	47%				442	49%

# Risultati Alberghi



**Concentrazine di Legionella tra  $10^3$ - $10^4$  UFC/L=**

✓ assenza di casi → misure di controllo/valutazione del rischio

✓ presenza di casi → bonifica ambientale

**Concentrazine di Legionella  $> 10^4$  UFC/L=**  
**CONTAMINAZIONE IMPORTANTE** (misure di decontaminazione sia in presenza che in assenza di casi)

## ALBERGO A

Legionella pn. 2-14 100%

Legionella pn 1 ASSENTE 100-8000 UFC/L

Legionella species ASSENTE

## ALBERGO B

Legionella pn. 2-14 66%

Legionella pn 1 33% 1000-80000 UFC/L

Legionella species 22%

## ALBERGO C

Legionella pn. 2-14 ASSENTE

Legionella pn 1 42.8% 200-75000 UFC/L

Legionella species 14.3%

## ALBERGO D

Legionella pn. 2-14 ASSENTE

Legionella pn 1 ASSENTE <100 UFC/L

Legionella species ASSENTE

## ALBERGO E

Legionella pn. 2-14 62 %.

Legionella pn 1 37.5% 1500-95000 UFC/L

Legionella species 50 %

## ALBERGO F

Legionella pn. 2-14 50 %.

Legionella pn 1 87.5% 2000-70000 UFC/L

Legionella species ASSENTE

## ALBERGO G

Legionella pn. 2-14 ASSENTE

Legionella pn 1 66.6% 7000-60000UFC/L

Legionella species ASSENTE

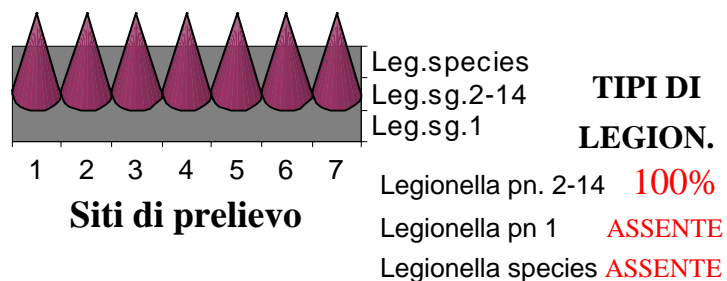
L. pneumophila 1 71.4% str. 83% camp.

L.pneumophila 2-14 57% str. 67% camp.

Legionella spp 43% str. 50% camp.

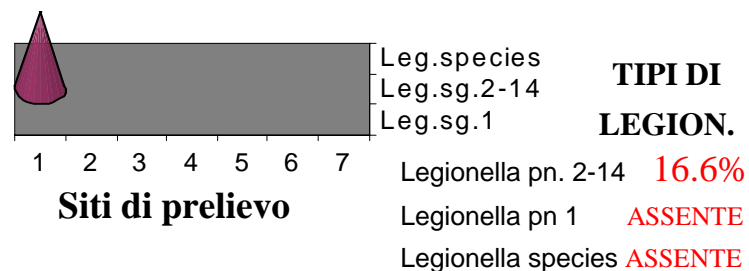
# RISULTATI DOPO IPERCLORAZIONE

Grafico 1: Risultati struttura A



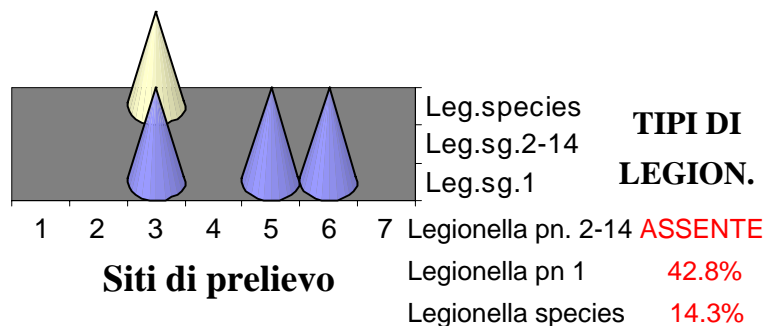
100-8000 UFC/L

Grafico 8: Risultati dopo Iperclorazione struttura A



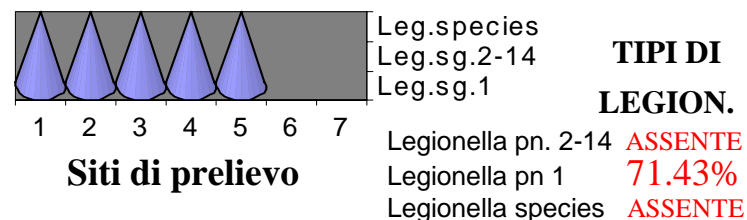
100-9500 UFC/L

Grafico 3: Risultati struttura C



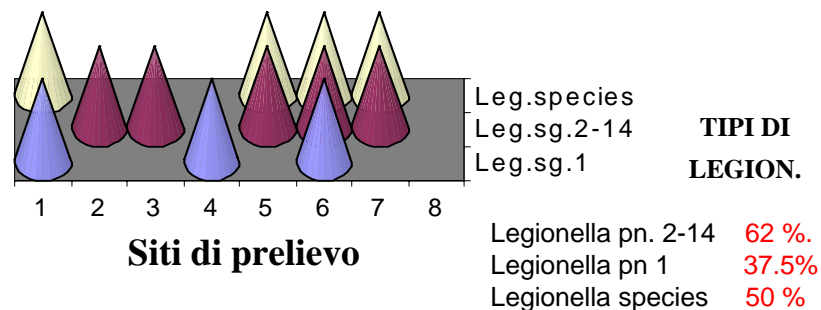
200-75000 UFC/L

Grafico 9: Risultati dopo iperclorazione struttura C



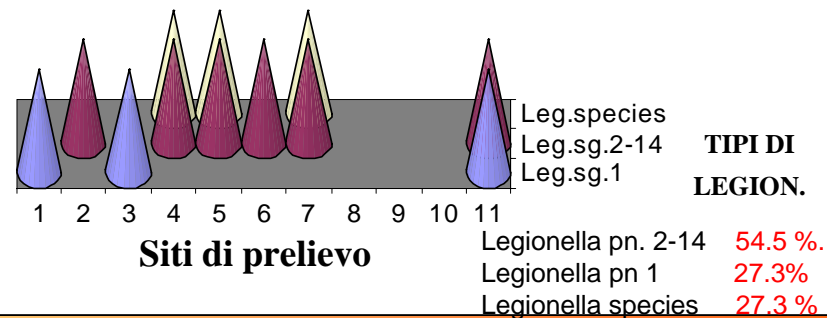
100-3000 UFC/L

Grafico 5: Risultati struttura E



1500-95000 UFC/L

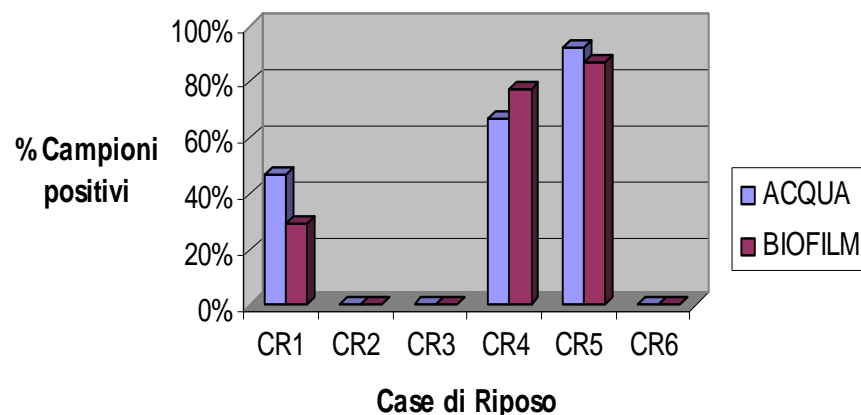
Grafico 10: Risultati dopo Iperclorazione struttura E



200-8000 UFC/L

# Risultati Case di Riposo

Campioni positivi di Legionella spp.(%) in Case di Riposo Molisane



**Concentrazine di Legionella tra  $10^3$ - $10^4$  UFC/L=**

- ✓ assenza di casi → misure di controllo/valutazione del rischio
- ✓ presenza di casi → bonifica ambientale

**Concentrazine di Legionella  $> 10^4$  UFC/L=**  
**CONTAMINAZIONE IMPORTANTE** (misure di decontaminazione sia in presenza che in assenza di casi)

## CASA DI RIPOSO 1

Legionella pn. 1 60%  
 Legionella pn. 2-14 ASSENTE 400-10.000 UFC/L  
 Legionella species ASSENTE

## CASA DI RIPOSO 2

Legionella pn. 1 ASSENTE  
 Legionella pn. 2-14 ASSENTE <100 UFC/L  
 Legionella species ASSENTE

## CASA DI RIPOSO 3

Legionella pn. 1 ASSENTE  
 Legionella pn. 2-14 ASSENTE <100 UFC/L  
 Legionella species ASSENTE

## CASA DI RIPOSO 4

Legionella pn. 1 83%  
 Legionella pn. 2-14 ASSENTE 100-9500 UFC/L  
 Legionella species ASSENTE

## CASA DI RIPOSO 5

Legionella pn. 1 ASSENTE  
 Legionella pn. 2-14 87.5% 2500-11.000 UFC/L  
 Legionella species 25%

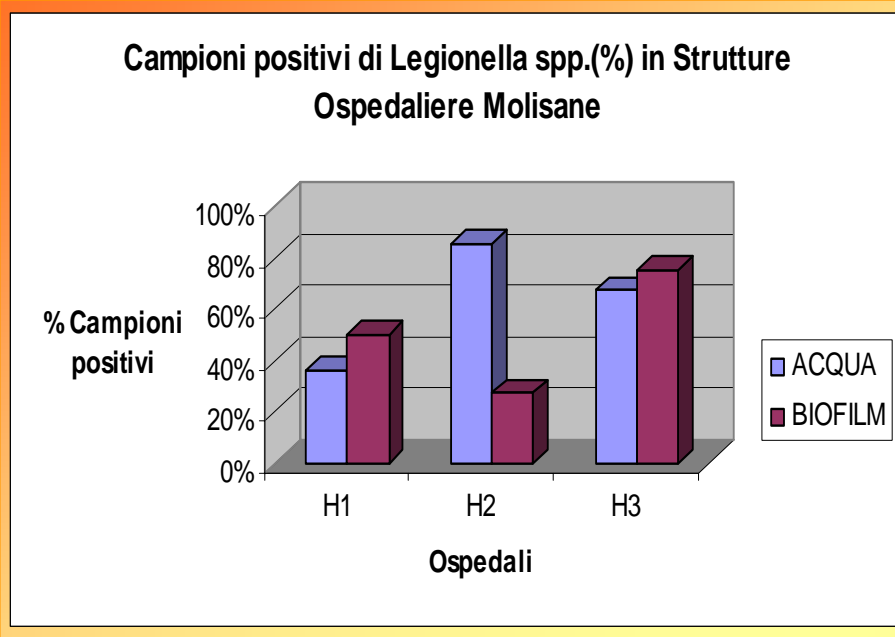
## CASA DI RIPOSO 6

Legionella pn. 1 ASSENTE  
 Legionella pn. 2-14 ASSENTE <100 UFC/L  
 Legionella species ASSENTE

L. pneumophila 1	33.3%str.	67%camp.
L.pneumophila 2-14	17%str.	33%camp.
Legionella spp	17%str.	33% camp.



# Risultati Ospedali/Case di Cura



Concentrazine di Legionella fino a  $10^2$  UFC/L=

**NESSUN INTERVENTO**

Concentrazine di Legionella tra  $10^3$ - $10^4$  UFC/L= **CONTAMINAZIONE**

✓ assenza di casi → aumentata sorveglianza clinica; ripetizione periodica dei controlli batteriologici

✓ presenza di casi → bonifica ambientale / specifiche misure di prevenzione e controllo

Concentrazine di Legionella  $> 10^4$  UFC/L= **CONTAMINAZIONE**

**IMPORTANTE** (misure di decontaminazione)

## OSPEDALE 1

Legionella pn. 2-14 38.5%

Legionella pn 1 ASSENTE 100-8000UFC/L

Legionella species ASSENTE

## OSPEDALE 2

Legionella pn. 2-14 25%

Legionella pn 1 62.5% 100-95000UFC/L

Legionella species ASSENTE

## OSPEDALE 3

Legionella pn. 2-14 66.7%

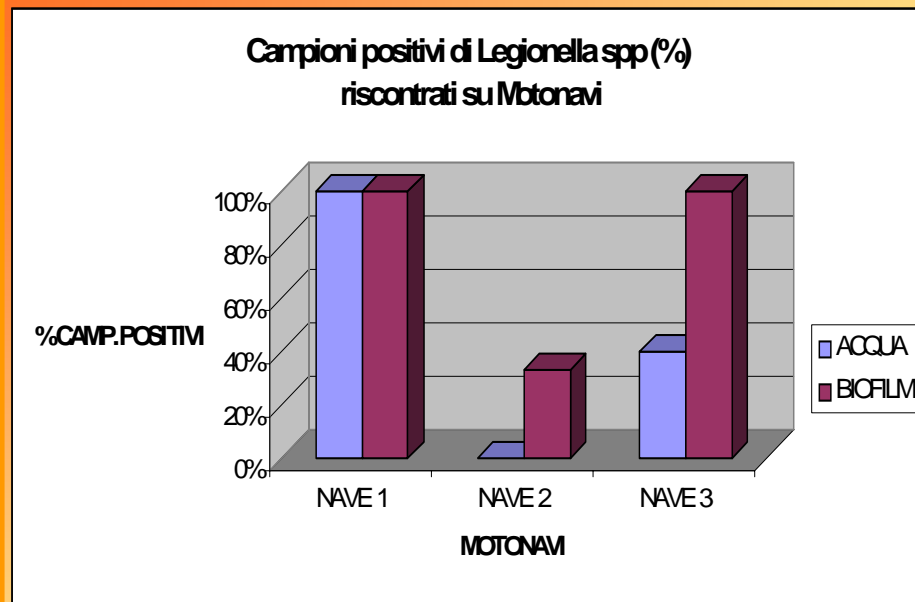
Legionella pn 1 ASSENTE 100-18000 UFC/L

Legionella species ASSENTE

L. pneumophila 1	33%str.	33%camp.
L.pneumophila 2-14	100% str.	100% camp.
Legionella spp	0% str.	0% camp.



# Risultati Motonavi



**Concentrazioni di Legionella tra  $10^3$ - $10^4$  UFC/L=**

- ✓ assenza di casi → misure di controllo/valutazione del rischio
- ✓ presenza di casi → bonifica ambientale

**Concentrazioni di Legionella >  $10^4$  UFC/L=**  
**CONTAMINAZIONE IMPORTANTE** (misure di decontaminazione sia in presenza che in assenza di casi)

## NAVE 1

Legionella pn. 1	75%	
Legionella pn. 2-14	50%	150- >100.000UFC/L
Legionella species	75%	

## NAVE 2

Legionella pn. 1	25%	
Legionella pn. 2-14	ASSENTE	<100 UFC/L
Legionella species	ASSENTE	

## NAVE 3

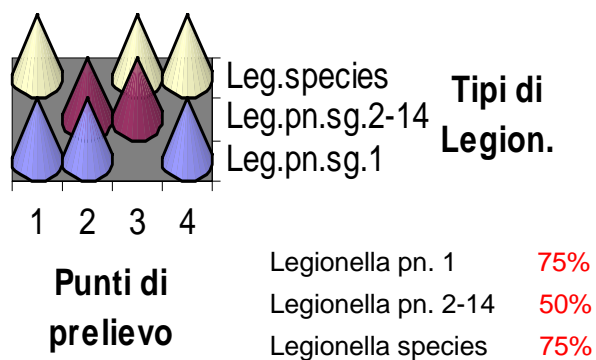
Legionella pn. 1	20%	
Legionella pn. 2-14	ASSENTE	100-500UFC/L
Legionella species	40%	

L. pneumophila 1	100% camp.	100% camp.
L.pneumophila 2-14	33% camp.	33% camp.
Legionella spp	67% camp.	67% camp.



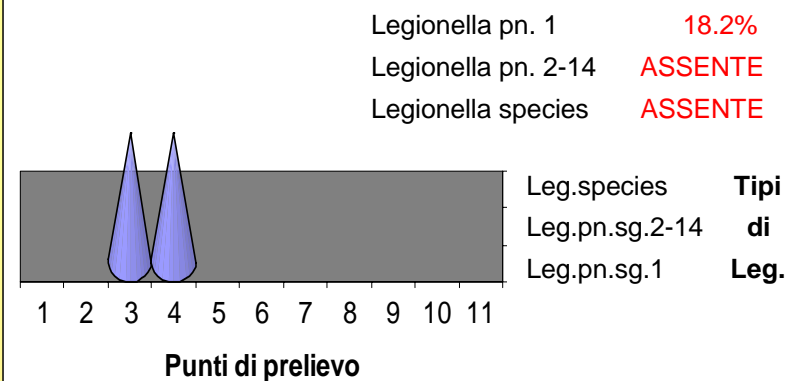
## RISULTATI DOPO IPERCLORAZIONE

### Risultati NAVE 1



150- >100.000UFC/L

### Risultati dopo Iperclorazione Nave 1

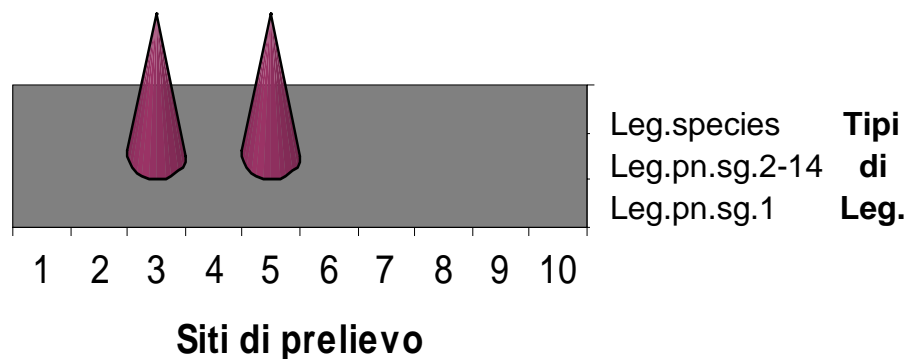


<100- 3500UFC/L



## Risultati Case Circondariali

### Risultati Casa Circondariale



### CASA CIRCONDARIALE

**Legionella pn. 1** ASSENTE

**Legionella pn. 2-14** 20% <100-39000 UFC/L

**Legionella species** ASSENTE

**Concentrazine di Legionella tra  $10^3$ - $10^4$  UFC/L=**

✓ assenza di casi → misure di controllo/valutazione del rischio

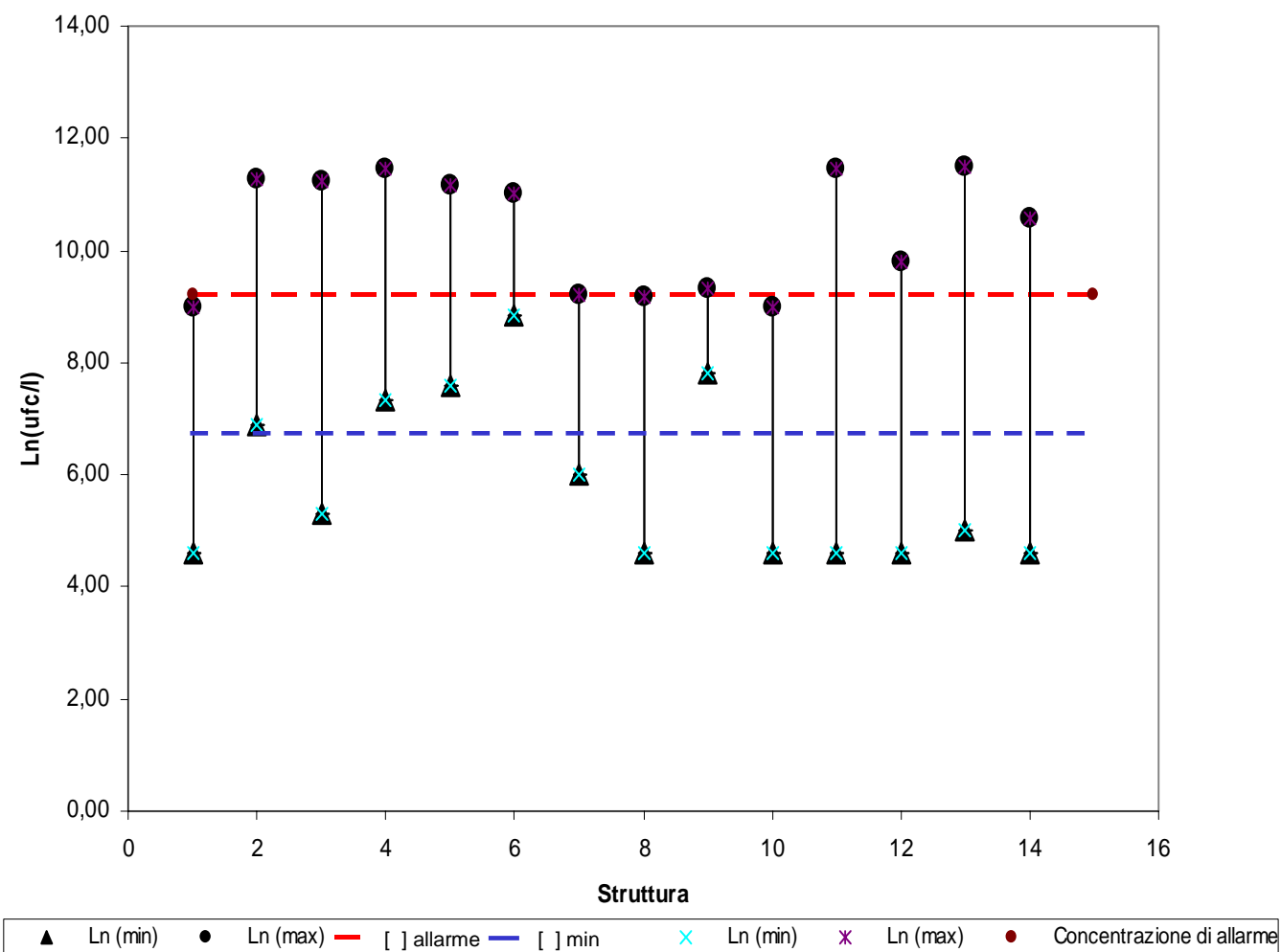
✓ presenza di casi → bonifica ambientale

**Concentrazine di Legionella >  $10^4$  UFC/L=**

**CONTAMINAZIONE IMPORTANTE (misure di decontaminazione sia in presenza che in assenza di casi)**



## Distribuzione dei range delle cariche



ALB 1	100-8000 UFC/L
ALB 2	1000-80000 UFC/L
ALB 3	200-75000 UFC/L
ALB 5	1500-95000 UFC/L
ALB 6	2000-70000 UFC/L
ALB 7	7000-60000 UFC/L
CR 1	400-10000 UFC/L
CR 4	100-9500 UFC/L
CR 5	2500-11000 UFC/L
H 1	100-8000 UFC/L
H2	100-95000 UFC/L
H 3	100-18000 UFC/L
NAVE 1	150->100000 UFC/L
CC1	100-39000 UFC/L

## CONCLUSIONI (1/2)

E' stata riscontrata una contaminazione diffusa

**ALBERGHI**  
6 strutture su 7

**OSPEDALI**  
3 strutture su 3

**CASA CIRCONDARIALE**  
1 struttura su 1

**NAVI**  
3 strutture su 3

**CASE DI RIPOSO**  
3 strutture su 6 (esito negativo in piccole strutture che non utilizzano serbatoi di accumulo acqua calda)

➤ Legionelle identificate: Leg. pn. sierogruppi 1, 2-14 e species; prevalenza della prima e della seconda, in 16 strutture su 20 controllate;

➤ Concentrazioni rilevate: tra  $10^1$  e  $>10^5$  ;

➤ **IMPORTANTE:** temperatura massima di esercizio ----- ( $53^\circ\text{C}$  riduce significativamente la presenza di Legionella, in quanto il germe non è in grado di moltiplicarsi a temperature  $> 45^\circ\text{C}$  e viene rapidamente inattivato a temperature  $> 60^\circ\text{C}$ ;



## CONCLUSIONI (2/2)

*“Gli interventi di bonifica (4 strutture su 20) applicati tramite iperclorazione non hanno prodotto risultati pienamente soddisfacenti in quanto, se pur in concentrazioni minori, la Legionella è ancora presente”*



O  
B  
B  
I  
E  
T  
T  
I  
V  
I

- Estendere le attività di sorveglianza e monitoraggio di Legionella a tutto il territorio molisano (ospedali/case di cura, case di riposo, case circondariali)
- Promuovere la diagnosi di legionellosi a livello ospedaliero (antigene solubile urinario, coltura, sierodiagnosi)



GRAZIE PER L'ATTENZIONE