

VALUTAZIONE DEL RISCHIO BIOLOGICO LEGIONELLA PRESSO STRUTTURE RICETTIVE IN PROVINCIA DI ROMA

F. MASSONI*, D.A. GIORGI**, S. PALMIERI**, G. RENZI**, S. RICCI*

Introduzione

La Legionella è un batterio Gram-negativo agente eziologico di polmonite. Il genere Legionella comprende oltre 40 specie (con la specie Legionella pneumophila la più comune, causa di oltre il 90% dei casi di legionellosi) e ben 64 sierogruppi (1). L'infezione umana avviene attraverso l'inalazione di aerosol di acqua contaminata ed è in grado di sopravvivere anche per lunghi periodi in presenza di scarsi nutrienti ambientali (2).

Solitamente associata ad infezione nosocomiale in quanto diffusa nei sistemi idrici di vecchi edifici ospedalieri presenti nel nostro Paese (3-6). Mentre è stato ampiamente studiato il rischio di infezione per i pazienti, poco si conosce circa i rischi per il personale ospedaliero (7).

Per quanto riguarda il rischio professionale in altri contesti lavorativi, diversi da quello sanitario, la letteratura risulta ancora più carente.

Viene descritta nell'industria ceramica spagnola una casistica di 21 episodi l'anno di polmonite da Legionella nel periodo 2002-2006 (8).

Nei lavoratori delle miniere sudafricane una dosaggio di anticorpi anti - L. pneumophila (sierogruppi 1-4) è stato possibile nel 36% dei lavoratori e 10% degli operai (9).

In virtù della presenza documentata in letteratura di ceppi batterici riscontrati nei sistemi idrici di edifici anche non sanitari, come hotel o terme (10-12), ed in conseguenza di uno scarso interesse rivolto nei confronti del rischio professionale, questo studio si pone come obiettivo quello di analizzare il rischio Legionella presso strutture ricettive distribuite nel territorio provinciale di Roma al fine di rafforzare la convinzione che vuole rilievo e monitoraggio di legionella negli impianti idrici come elementi necessari per prevenire e controllare la legionellosi (13).

* Dipartimento di Scienze anatomiche, istologiche, medico legali e dell'apparato locomotore - Università degli studi "Sapienza" di Roma.

** ARPALazio - Servizio Ambiente e Salute - Sezione provinciale di Roma.

Materiale e metodi

Sono stati analizzati 585 campioni, così ripartiti: 39,48% nel 2007, 32,99% nel 2008 e 27,53% nel 2009. Le strutture esaminate sono state camping (3,24%), hotel (89,57%) e residenze religiose (7,19%).

Nel 2007 i campioni sono stati prelevati: il 32,46% nel I trimestre, 20,34% nel II, 10,38% nel III ed, infine, 36,82% nel IV trimestre.

Nel 2008 il 13,47% nel I, l'11,91 nel II, il 30,56% nel III ed il 44,06% nel IV trimestre.

Nel 2009 il 12,42% nel I, il 22,98% nel II, il 39,75% nel III ed il 24,85% nel IV. I terreni di coltura impiegati per la semina sono GVPC-agar, BCYE-agar e CYE agar base ed i reagenti per la preparazione del campione sono una soluzione di Ringer o compresse di Ringer, mentre per il trattamento di decontaminazione è stato usato tampone acido HCl/KCl a pH 2,2.

Per l'identificazione sono stati usati il Legionella Latex Test ed il Slidex Legionella Kit.

La procedura seguita è stata la seguente.

Dal campione si è proceduto al prelievo di 10 ml inseriti in un contenitore sterile con tappo a vite ed il resto filtrato per mezzo di rampe filtranti, utilizzando imbuto e bicchieri sterilizzati mediante flambatura. Dopo filtrazione la membrana inserita nel contenitore sterile con i 10 ml precedentemente prelevati e sottoposta ad agitatore (15 minuti a 150 rpm) per ottenere il distacco dei batteri catturati e la risospensione.

Il concentrato, una volta analizzato prima e dopo trattamento a caldo (semina su terreno di coltura selettivo dopo il trattamento di decontaminazione con il trasferimento di 1,5 ml in contenitore sterile, in bagnomaria a $T^{\circ}C = 50 \pm 1$, per 30 ± 2 min.), viene conservato al buio, in frigorifero a $T^{\circ}C = 6 \pm 2$ per non oltre 14 giorni. La semina del campione d'acqua concentrato, 0,1 ml, si esegue su terreno colturale di tipo selettivo, ovvero GVPC-agar che, grazie alla presenza di L-cisteina ed alcuni antibiotici, consente esclusivamente la crescita della Legionella.

Le piastre vengono incubate in aerobiosi, in termostato a $T^{\circ}C = 37 \pm 1$, con 2,5% di CO_2 e in ambiente umido al massimo per 10 giorni.

Le colonie, di piccole dimensioni, di colore bianco-grigio, leggermente convesse e con margini regolari, che crescono già dopo 2-3 giorni di incubazione vengono sottoposte ad un'identificazione presuntiva e poi ad una definitiva.

Queste colonie, considerate Legionelle spp "SOSPETTE"(S), vengono isolate su due terreni colturali di tipo non selettivo quali il BCYE-agar (con L-cisteina) che sviluppa Legionella, e CYE agar base (o BCYE-Cys: privo di L-cisteina) sul quale, invece, le colonie di Legionella non crescono per assenza del supplemento di crescita.

Dopo 2 giorni di incubazione a $T^{\circ}C = 37 \pm 1$, se si osserva una crescita delle colonie esclusivamente su terreno contenente cisteina, allora le colonie che inizial-

mente erano sospette vengono identificate come “PRESUNTE”(P) e, quindi, con un diametro di almeno 1 mm, sottoposte al test di agglutinazione al lattice. Un test che consente, grazie a particelle di lattice blu sensibilizzate con anticorpi specifici di coniglio che reagiscono con gli antigeni presenti sulla parete cellulare di *Legionella pneumophila* e *Legionella species*, un precipitato. Se le particelle agglutinano in meno di 1 minuto viene confermata la presenza di *Legionella pneumophila*, sierogruppi 1 o 2-14, o *Legionella species* e, dunque, solo allora si parlerà di Legionelle “DEFINITIVE”(D) .

Risultati

Nel 2007 i campioni non conformi risultano il 7,79%, nel 2008 diventano il 9,84% ed infine il 18,01% nel 2009.

Il livello di contaminazione risulta basso (tra 100 ufc e 1000 ufc) nel 3%, medio (tra 1000 ufc e 10000 ufc) nel 4% ed alto(>10000 ufc) nell'1% dei campioni del 2007.

Nel 2008 3% basso, 5% medio e 2% alto.

Nell'anno seguente basso nel 7%, medio nel 9% ed, infine, alto nel 2%.

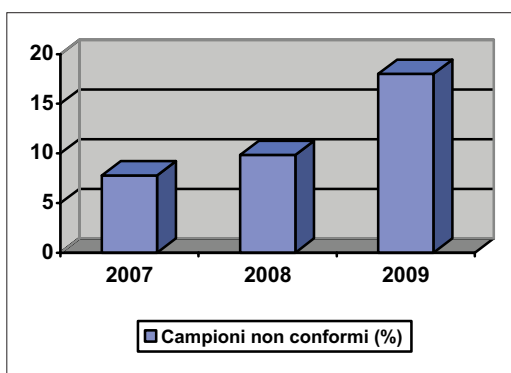


Fig. 1: Campioni non conformi nel triennio 2007-2009.

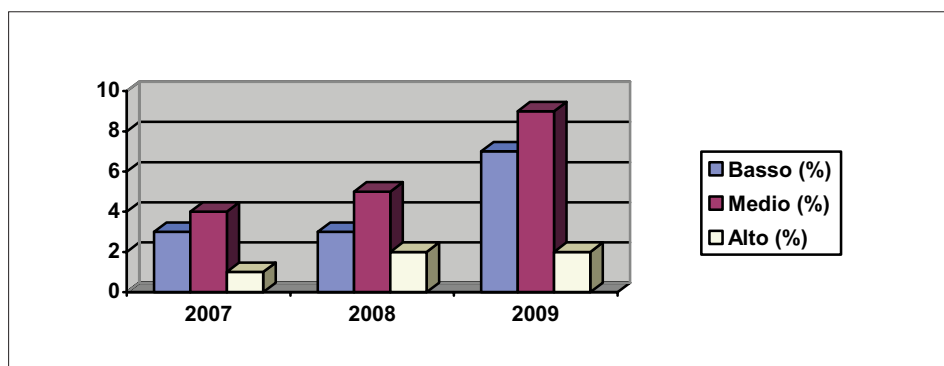


Fig. 2: Livello di contaminazione nel triennio 2007-2009.

Nel 2007 l'indagine è stata effettuata esclusivamente presso hotel e di questi campioni l'8% è risultato non conforme.

Nel 2008 i prelievi da hotel non conformi sono diventati il 10%, accompagnati da un 25% dei prelievi da camping ugualmente non conformi.

Infine nel 2009 la distribuzione dei prelievi non conformi è stata del 20% dei prelievi da hotel e 19% dei prelievi da residenze religiose.

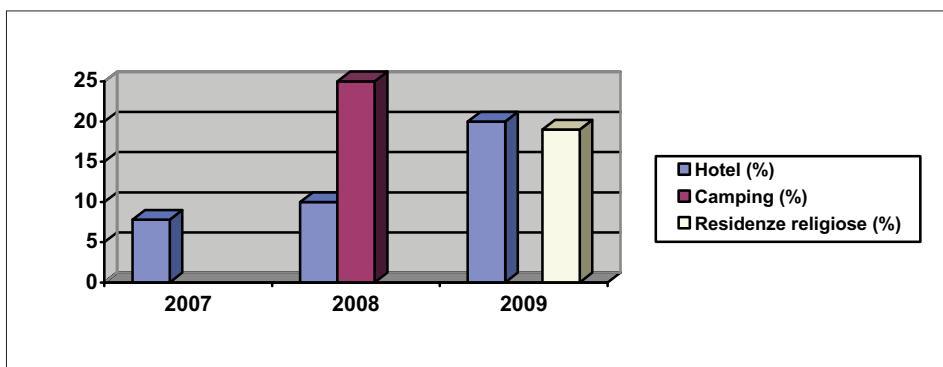


Fig. 3: Campioni non conformi per tipo di struttura ricettiva.

I punti di prelievo sui quali si è concentrata l'attenzione sono nel particolare docce e lavandini, lavabo, bidet e sistemi di areazione.

Nel 2007 un livello di contaminazione basso ha riguardato il 3% dei prelievi da doccia ed il 5% da lavandino; un livello medio il 3% da lavandino ed un 6% da doccia; alto solo in un 3% da lavandino.

Nel 2008 un livello basso di contaminazione ha riguardato il 5% dei lavandini campionati ed il 1% delle docce. I livelli medi di contaminazione il 5% dei lavandini ed il 4% delle docce. Alto il 5% dei lavandini ed il 2% delle docce.

Nel 2009 il 7% dei prelievi da lavandino sono risultati con un basso livello di contaminazione, il 9% delle docce esaminate ed il 13% dei bidet. Il 13% dei lavandini un medio livello di contaminazione, come il 9% delle docce. Il 2% dei lavandini ha presentato un alto livello di contaminazione, e solo l'1% delle docce.

Conclusioni

Nonostante l'attività di campionamento si sia numericamente ridotta, la percentuale di non conformità è passata dal 7,79% del 2007, al 9,84% del 2008 e, quin-

di, al 18,01% nel 2009. Questi dati, di carattere generale, depongono per una minor attenzione riservata nel corso del tempo, cui ha fatto seguito, purtroppo, un incremento del rischio, come si deduce anche dai livelli di contaminazione. Una bassa contaminazione ha interessato il 3% dei prelievi del 2007 e del 2008, ma il 7% del 2009. Ugualmente il livello di contaminazione medio è passato dal 4% del 2007, al 5% del 2008, per arrivare al 9% del 2009.

Per quanto concerne le strutture esaminate, l'8% di non conformità riscontrata nel 2007 negli hotel, divenuto 10% nel 2008 e 20% nel 2009, può essere agevolmente spiegato dalla distribuzione dell'attività di campionamento, che solo nel 10,43% ha riguardato strutture diverse dagli hotel.

Infine, la tipologia di punti prelievo prescelti, mirata in funzione delle conoscenze acquisite dalla letteratura scientifica in merito alle modalità di contagio della legionella, ha confermato la tesi di un maggior rischio derivante dall'esposizione a fonti come la doccia ed il lavandino.

Dall'analisi dei dati si evidenzia come il rischio biologico da legionella non debba essere esclusivamente associato a strutture nosocomiali e come, nelle strutture ricettive, data la prolungata esposizione soprattutto del personale, ed in misura maggiore di quello addetto alle pulizie, non si esclude come il rischio sia da considerare necessariamente superiore. Quanto detto motiva ed argomenta in fase preventiva l'adozione di adeguate misure di depurazione degli impianti di climatizzazione, produzione e stoccaggio di acqua calda e delle reti idriche in generale, in fase di controllo il monitoraggio degli addetti esposti al rischio previo dosaggio, ad esempio, del titolo anticorpale anti Legionella.

RIASSUNTO

La polmonite da legionella pneumophila viene solitamente associata ad infezioni nosocomiali in virtù di un maggior rischio dei pazienti che versano in uno stato di malattia ed immunodepressione. Tuttavia, gli organismi pubblici, come l'Agenzia Regionale Protezione Ambiente (ARPA), deputati al controllo, non si limitano esclusivamente all'analisi di strutture sanitarie, bensì estendono il loro raggio d'azione ad altri tipi di possibili fonti di contagio, quali le strutture ricettive.

Gli Autori propongono una analisi del rischio infezione da legionella attraverso la presentazione di una casistica dell'attività di laboratorio operata dalla Sezione provinciale dell'ARPALazio su campioni provenienti da strutture ricettive dislocate sul territorio provinciale di Roma.

Sono stati analizzati 585 campioni, così ripartiti: 39,48% nel 2007, 32,99% nel 2008 e 27,53% nel 2009. Le strutture esaminate sono state camping (3,24%), hotel (89,57%) e residenze religiose (7,19%).

Nel 2007 i campioni non conformi risultavano il 7,79%, nel 2008 diventano il 9,84% ed infine il 18,01% nel 2009.

SUMMARY

Pneumonia caused by *Legionella pneumophila* is usually associated with nosocomial infections because of an increased risk of patients who are in a state of disease and immunosuppression. However, public authorities, such as the Regional Environmental Protection Agency (EPA), responsible for the control, are not limited only to the analysis of health care facilities, but extend their reach to other possible sources of contamination, such as the residential facilities.

The authors propose a risk analysis *Legionella* infection through the presentation of a case study of laboratory operated by the provincial section of ARPALazio on samples from accommodation located in the province of Rome.

585 samples were analyzed, as follows: 39,48% in 2007, 32,99% in 2008 and 27,53% in 2009. The structures examined were camping (3,24%), hotels (89,57%) and religious residences (7,19%).

In 2007 the non-compliant samples were 7,79%, 9,84% in 2008 and finally become 18,01% in 2009.

BIBLIOGRAFIA

- [1] YÁÑEZ M.A., CARRASCO-SERRANO C., BARBERÁ V.M., CATALÁN V.: *Quantitative detection of Legionella pneumophila in water sample by immunomagnetic purification and Real-Time PCR amplification of the dotA gene*, in *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005; 71: 3433-3441.
- [2] CHANG C.W., HWANG Y.H., CHENG W.Y., CHANG C.P.: *Effects of chlorination and heat disinfection on long-term starved Legionella pneumophila in warm water*, in *J. Appl. Microbiol.*, 2007;102: 1636-1644.
- [3] OZEROL I.H., BAYRAKTAR M., CIZMECI Z. *et al.*: *Legionnaires' disease: a nosocomial outbreak*, in *Turkey J. Hosp. Infect.*, 2006; 62: 50-57.
- [4] VICKERS R.M., YU V.L., HANNA S.S. *et al.*: *Determinants of L. pneumophila contamination of water distribution systems: 15 hospital prospective study*, in *Infect Control*, 1987; 8: 357-363.
- [5] BORELLA P., MONTAGNA M.T., ROMANO-SPICA V. *et al.*: *Environmental diffusion of Legionella spp and legionellosis frequency among patients with pneumonia: preliminary results of a multicentric Italian survey*, in *Ann. Ig.*, 2003; 15: 493-503.
- [6] BORELLA P., MONTAGNA M.T., STAMPI S. *et al.*: *Legionella contamination in hot water of Italian hotels*, in *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005; 71: 5805-5813.

- [7] MURACA P.W., STOUT J.E., YU V.L., YEE Y.C.: *Legionnaires' disease in the work environment: implications for environmental health*, in *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1988; 49: 584-590.
- [8] BELLIDO-BLASCO J.B., PELAZ-ANTOLÍN C., DELAS-GONZÁLEZ M.A., SARRIÓN-MARTÍNEZ J., MORENO-MUÑOZ M.R., HERRERO-CAROT C.: *Aggregation of cases of legionella pneumonia in workers related to the ceramic industry in Castellon, Spain*, 2006, in *Rev. Esp. Salud Publica*, 2008;82(1):111-6.
- [9] BARTIE C., KLUGMAN K.P.: *Exposures to Legionella pneumophila and Chlamydia pneumoniae in South African Mine Workers*, in *Int. J. Occup. Environ. Health.*, 1997;3(2):120-127.
- [10] WELLINGHAUSEN N., FROST C., MARRE R.: *Detection of legionellae in hospital samples by quantitative Real-Time LightCyrcler PCR*, in *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001;67: 3985-3993.
- [11] MOUCHTOURI V., VELONAKIS E., TSAKALOF A., KAPOULA C., GOUTZIANA G., VATOPOULOS A., KREMASINOU J., HADJICHRISTODOULOU C.: *Risk factors for contamination of hotel water distribution systems by Legionella species*, in *Appl Environ Microbiol*, 2007; 73: 1489-1492.
- [12] EDAGAWA A., KIMURA A., DOI H., TANAKA H., TOMIOKA K., SAKABE K., NAKAJIMA C., SUZUKI Y.: *Detection of culturable and nonculturable Legionella species from hot water systems of public buildings in Japan*, in *J. Appl. Microbiol.*, 2008; 105: 2104-2114.
- [13] DELGADO-VISCOGLIOSI P., SIMONART T., PARENT V., MARCHAND G., DOBBELAERE M., PIERLOT E., PIERZO V., MENARE-SZCZEBARA F. *et al.*: *Rapid method for enumeration of viable Legionella pneumophila and other Legionella spp. in water*, in *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005;71: 4086-4096.