



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI BARI
ALDO MORO

Dipartimento di Scienze Biomediche
e Oncologia Umana



UNIMORE
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
MODENA E REGGIO EMILIA

Dipartimento di Scienze Biomediche
Metaboliche e Neuroscienze

CONVEGNO NAZIONALE

Legionellosi:
*una malattia prevenibile
con una gestione integrata
del rischio ambientale*

Responsabili scientifici

Maria Teresa Montagna
Paola Borella



Bari, 30-31 maggio e 1 giugno 2019
Aula Magna "G. De Benedictis" - Policlinico

Monitoraggio della contaminazione microbica negli ambienti a rischio anche attraverso metodologie molecolari

Moderatori: **Pasqualina Laganà (Messina), Maria Teresa Montagna (Bari)**

- 09.00 Approcci metodologici per la valutazione del rischio *Legionella* in ambienti di vita e di lavoro
Antonella Mansi (Roma)
- 09.30 Ricerca di *Legionella* in campioni ambientali: metodi tradizionali e innovativi
Maria Luisa Ricci (Roma)
- 10.00 Discussione
- 10.30 *Coffee break*

Strategie per gestire i rischi nei sistemi aero-idraulici di strutture sanitarie e turistico-alberghiere

Moderatori: **Bianca Maria Borrini (Parma), Antonella Mansi (Roma)**

- 11.00 Il controllo del rischio legionellosi in strutture ricreative e termali
Erica Leoni (Bologna)
- 11.30 Valutazione e gestione del rischio *Legionella* in ambienti industriali e nelle torri evaporative
Annalaura Carducci (Pisa)
- 12.00 L'esperienza dell'ASL Romagna nella valutazione del rischio impiantistico nelle strutture sanitarie
Paolo Bianco (Rimini)
- 12.30 Discussione
- 13.00 *Lunch*

Azioni preventive e protettive: esperienze a confronto sulle diverse tecnologie di trattamento dell'acqua

Moderatori: **Paola Borella (Modena), Erica Leoni (Bologna)**

- 14.30 Impiego dei disinfettanti: un sistema integrato per la gestione degli impianti
Maria Anna Coniglio (Catania)
- 15.00 Vantaggi e svantaggi di diversi biocidi nel controllo della contaminazione da *Legionella* in ospedale
Isabella Marchesi (Modena)

COMUNICAZIONI ORALI

- 15.30 Un sistema completo per la prevenzione della legionellosi in un ospedale
Maurizio Gimigliano, Francesco Talarico, Pasquale Minichella
- 15.45 Esperienza ventennale di controllo del rischio di contaminazione da *Legionella* spp nella rete idrica della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia
Viola Novelli, Sara Cutti, Stefano Cacitti, Lorenzo Blandi, Carlo Marena, Alba Muzzi
- 16.00 Distribuzione dei sierogruppi di *Legionella pneumophila* pre- e post-attivazione del biossido di cloro presso la Fondazione Policlinico A. Gemelli IRCCS di Roma
Sara Vincenti, Daniele Ignazio La Milia, Federica Boninti, Patrizia Laurenti
- 16.15 Nuovo metodo per un rapido rilevamento di *Legionella* nei campioni di acqua
Sabina Di Maio, Gabriele Messina, Rosa Cardaci, Sandra Burgassi, Gabriele Cevenini, Francesca De Marco, Daniele Lenzi
- 16.30 Sorveglianza ambientale di *Legionella pneumophila* in 13 residenze di lunga degenza del Nord Italia e confronto tra metodi di trattamento diversi
Marina Tesaura, Carla Dotti, Michela Consonni
- 16.45 Confronto tra membrane con diversa porosità per la conta di *Legionella* secondo la ISO 11731:2017
Osvelda De Giglio, Giusy Diella, Paolo Trerotoli, Marina Tesaura, Michela Consonni, Pasqualina Laganà, Roberta Palermo, Maria Teresa Montagna
- 17.00 Scelta del metodo per la conta di *Legionella pneumophila* in acque secondo ISO 11731:2017 in ambito di accreditamento
Alessandro Viganò, Laura Vallati, Fausto Consonni, Elena Gervasoni, Rita Appolloni & Working Group
- 17.15 Chiusura della seconda giornata

UN NUOVO METODO PER UN RAPIDO RILEVAMENTO DELLA LEGIONELLA IN CAMPIONI DI ACQUA

Antonio Sabina¹, Messina Gabriele¹, Cardacci Rosa¹, Burgassi Sandra¹, Cevenini Gabriele², Trovati Francesco³, Lenzi Daniele⁴

¹ Dipartimento di Medicina Molecolare e dello Sviluppo, Università di Siena, Siena, Italia

² Dipartimento di Biotecnologie Mediche, Università di Siena, Siena

³ Direzione Medica di Prestidio, Azienda ospedaliera Universitaria Senese, Siena

⁴ Direzione Medica di Prestidio, Ospedale Misericordia di Grosseto, Grosseto

Introduzione

La sorveglianza nei sistemi idrici di assistenza sanitaria rappresenta un problema mondiale, in quanto nei reparti critici. Il metodo standard per il suo rilevamento nei campioni d'acqua prevede il prelievo di acqua con tecniche di filtrazione a membrana, che richiede circa 10-13 giorni per i risultati. Sonde genetiche marcate con fluorocromi e metodi di rilevamento in tempo reale, possono rilevare la presenza di *Legionella* spp. e *Legionella pneumophila* (*Lpn*) in circa 75 minuti. Lo scopo dello studio è stato quello di confrontare la validità del metodo standard rispetto alla nuova metodologia di rilevamento per il campione positivo e al calore.

Materiali e Metodi

Lo studio è stato condotto nell'ospedale di Siena, nel mese di aprile 2015. Sono stati raccolti 19 campioni di acqua potabile mediante prelievo pre-flush dopo la rimozione del filtro terminale del rubinetto dell'acqua. Le acque di acqua sono state studiate secondo le Linee guida/ordine. Campioni di acqua, con/ senza cloro, sono stati utilizzati come gold standard e confrontati con campioni che sono stati analizzati con il GPM sia con trattamento acido sia al calore. Piastre Petri sono state inoculate e incubate per 10 giorni (metodo standard), mentre con il GPM per 72 +/- 4 ore. L'area sotto la curva è stata utilizzata per valutare l'accuratezza discriminante del GPM rispetto al metodo standard. La validità di rilevamento per il campione positivo è stata fissata a 1000 CFU/L a seguito di valutazioni standard.

Risultati

La sensibilità e l'accuratezza è stata raggiunta per l'individuazione di *Lpn*, sia per GPM con trattamento acido (AUC = 0,91) che al calore (AUC = 0,97). Un AUC di 0,81 è risultato per *Legionella* spp. con il metodo GPM rispetto al metodo di coltura senza trattamento al calore.

Conclusioni

I due metodi GPM sono accurati e predittivi nell'individuazione di *Lpn*, mentre per *Legionella* spp. è necessario che il trattamento acido possa essere preferibile. Il vantaggio del metodo GPM rispetto al metodo standard come ad esempio la PCR è l'identificazione solo degli organismi vitali. Il metodo GPM può essere una risposta rapida può essere un utile strumento per garantire la sicurezza ambientale sanitario e quindi anche per quella dei pazienti.

SORVEGLIANZA AMBIENTALE DI LEGIONELLA PNEUMOPHILA IN 13 CITTÀ DEL NORD ITALIA E CONFRONTO TRA METODI DI TRATTAMENTO DIVERSI

Tesauro Marina¹, Doti Carla², Consonni Michela¹

¹ Dipartimento di Scienze Biomediche Chirurgiche Odontoiatriche - Università degli Studi di Milano, Milano

² Direzione Sanitaria - Fondazione Sacra Famiglia - Cesano Boscone, Milano

Introduzione

La sorveglianza ambientale di *Legionella pneumophila* (*Lpn*) è iniziata in due strutture sanitarie dedicate all'assistenza e riabilitazione residenziale, a cui successivamente se ne sono aggiunte altre 11, sempre afferenti alla Fondazione Sacra Famiglia e ospitanti circa 2500 minori e adulti disabili mentali e anziani. Ogni sede ha peculiarità proprie: i pazienti ospitati presentano disabilità diverse tra loro, con gravità differenti; le strutture sanitarie sono state costruite in blocchi unici o separati, con impianti idrici modificati e ampliati nel tempo. Scopo del lavoro è stato analizzare i dati della sorveglianza effettuata negli anni 2009-2018, confrontando i risultati prima e dopo il trattamento con biossido di cloro (5 sedi) e monoclorammina (2 sedi).

Metodi

I campionamenti sono normalmente semestrali, con incremento della frequenza in caso di positività elevate. I campioni di acqua sono stati analizzati secondo la norma "ISO 11731-2_2004 Water quality - Detection and enumeration of *Legionella* part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts". I risultati pre- e post-trattamento sono stati analizzati calcolando numero di campioni positivi e negativi per sede, valore massimo, minimo e mediano in Unità Formanti Colonie/Litro (UFC/L), e distinzione per sterogruppo (sg) 1, 2-14 o *Legionella* species in percentuale.

Risultati

I risultati si riferiscono a 1645 campioni nelle 13 sedi: 51,8% risultano "Not detected", 36% fino a 100 UFC/L, 7% tra 101-1000 UFC/L, 5% tra 1001-10000 UFC/L, 0,2% superiore a 10000 UFC/L. In generale, tutte le sedi trattate, sia con biossido sia con monoclorammina, evidenziano una diminuzione delle positività e delle concentrazioni di *Lpn*; in particolare, tra quelle trattate con biossido (0,02-0,57mg/L), la sede 1, con il sistema idrico più vetusto e articolato, passa dall'86% di positività (mediana 310 UFC/L, con 22% *Lpn* sg1, 72% sg 2-14), a 28% (mediana 0 UFC/L, 26% sg 1 e 68% sg 2-14). Si osserva una situazione abbastanza sovrapponibile nelle sedi 3 e 12, ma non nella sede 9 dove oltre a diminuire la positività totale decrementano anche le percentuali del sg 1 (12,5% vs 7,5%). Nella sede 7, dove gli isolati appartenevano tutti al sg 1 prima del trattamento, si continua ad osservare la sola presenza di quel sg. Per quanto riguarda le sedi trattate con monoclorammina (1-3,34 mg/L), nella sede 11 si passa dal 77% di positività (mediana 450 UFC/L) al 31% (mediana 0 UFC/L) con la prevalenza di *Lpn* sg 2-14 in tutti gli isolati analizzati. La sede 13, entrata per ultima nella sorveglianza, passa dal 29% di positività (100% *Lpn* sg 1) a zero nel post trattamento.

Conclusioni

La sorveglianza ha permesso di evidenziare anomalie nei sistemi di trattamento in diverse occasioni. Entrambi i trattamenti permettono la diminuzione del numero di punti di prelievo positivi a *Lpn* e della concentrazione di *Lpn* in ciascun punto. Dai risultati emerge che la relazione tra tipo di disinfezione e prevalenza del sg di *Lpn* non sempre è sovrapponibile. Ulteriori studi molecolari saranno effettuati su acque trattate per verificare la presenza di microrganismi vitali ma non coltivabili e su ceppi isolati per indagare la resistenza al trattamento.

CONFRONTO TRA MEMBRANE CON DIVERSA POROSITÀ PER LA CONTA DI LEGIONELLA SECONDO LA ISO 11731:2017

De Giglio Osvalda¹, Diella Giusy¹, Trerotoli Paolo¹, Tesaurò Marina², Consommi Michela², Lagana Pasqualina³, Palermo Roberta³, Montagna Maria Teresa¹

1. Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Bari
2. Dipartimento di Scienze Biomediche, Chirurgiche e Odontoiatriche, Università degli Studi di Milano, Milano
3. Dipartimento di Scienze Biomediche, Odontoiatriche e delle Immagini Morfologiche e Funzionali, Università degli Studi di Messina, Messina

Introduzione

Le nuove Linee guida nazionali sul controllo e prevenzione della legionellosi prevedono l'utilizzo della ISO 11731:2017 per la conta di *Legionella* spp. in campioni di acqua, consentendo due metodi di analisi: 1) concentrazione ed eluizione, con membrane policarbonato Ø 47-142 mm e porosità 0,2 µm; 2) posa diretta su terreno di coltura, con membrane nitrocellulosa o esteri misti di cellulosa Ø 47-50 mm e porosità 0,2 µm o 0,45 µm. Scopo dello studio è confrontare i risultati ottenuti mediante filtrazione con membrane di esteri misti di cellulosa a diversa porosità e posa diretta sul terreno.

Materiali e Metodi

Lo studio è stato condotto in 3 Centri universitari (C1, C2, C3). È stata predisposta una sospensione di *Legionella pneumophila* (*Lpn*) (ATCC 33152) 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) in acqua distillata, da cui sono state allestite diluizioni scali fino a $1,5 \times 10$ UFC/mL; 100 ml di ciascuna diluizione sono stati filtrati attraverso 2 membrane sterili (0,45 µm e 0,2 µm) di esteri misti di cellulosa Ø 47 mm, ciascuna posta rispettivamente su 2 piastre contenenti BCYE agar. Per controllo, 1 ml di ciascuna diluizione è stato insemato su BCYE agar. Le piastre sono state incubate a 37°C (CO₂ al 2,5%) per 10 giorni. In parallelo, sono state allestite prove con *Escherichia coli* (ATCC 11775) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25668). Ogni prova è stata ripetuta 15 volte/Centro per una adeguata valutazione statistica. I dati sono stati sintetizzati come mediana e interquartili (IQ), non seguendo la distribuzione di Gauss. L'analisi è stata condotta con metodi non parametrici (testi di Friedman per confrontare i risultati tra le due diverse porosità e test di Kruskal Wallis per valutare eventuali differenze tra centri).

Risultati

La mediana (IQ range) ottenuta con l'uso della membrana 0,2 µm è risultata pari a 2 (2-3) UFC/mL, mentre con la membrana 0,45 µm è risultata pari a 9 UFC/mL (8-11), con una resa percentuale (R%) del 13,3% (13-20%) e del 60% (53-73%), rispettivamente. In entrambi i casi è emersa una differenza statisticamente significativa tra le 2 membrane ($p < 0,0001$). Limitatamente all'uso delle membrane 0,45 µm, C1 ha rilevato 11 UFC/mL (10-14), C2 9 UFC/mL (8-10) e C3 ha rilevato 8 UFC/mL (7-9). In termini di R%, C1 ha ottenuto 73,3% (67-93%) e C2 60% (53-67%) e C3 60% (47-60%), con una differenza statisticamente significativa ($p = 0,000086$) tra i Centri sia in termini di concentrazione sia di R%. Il metodo della semina diretta su piastra ha confermato il valore di $1,5 \times 10$ UFC/mL. *E. coli* e *Paeruginosa* hanno dato risultati sovrapponibili con le 2 membrane a diversa porosità.

Conclusioni

Il nostro studio evidenzia che il metodo della posa diretta su membrana secondo la ISO 11731:2017 permette un maggior recupero di *Legionella* con le membrane 0,45 µm rispetto a quelle 0,2 µm. Poiché i dati di letteratura inerenti la conta di *Legionella* nell'acqua per filtrazione fanno riferimento per lo più al metodo della concentrazione, è auspicabile pianificare ulteriori studi per verificare se i risultati possono dipendere dalle caratteristiche morfologiche dei microrganismi e dalla sua interazione con la membrana, in modo da orientare l'operatore verso una scelta consapevole.

SCELTA DEL METODO PER LA CONTA DI LEGIONELLA PNEUMOPHILA IN ACQUE SECONDO ISO 11731:2017 IN AMBITO DI ACCREDITAMENTO

Viganò Alessandro, Vailati Laura, Consommi Fausto, Gervasoni Elena, Appolloni Rita & Worki Group

Laboratorio AQ4GROUP SRL, Merate, Lecco

Introduzione

In materia di *Legionella pneumophila* (*Lpn*), i riferimenti normativi attuali (Testo Unico 81/08 Linee guida 79/CSR/2015) ed in prospettiva la proposta di direttiva UE 1.2.2018-753 forniscono congiuntamente indicazioni affinché il monitoraggio analitico sia svolto da laboratori accreditati ISO 17025 applicando la ISO 11731. La norma ISO 11731 presenta aspetti tecnici critici, soprattutto l'allegato J, matrice decisionale nella quale districarsi tra 14 procedure di prova. Si è pianificato lo studio sperimentale per valutare l'applicazione delle tecniche di concentrazione - utilizzabili qualora il numero delle legionelle non sia noto - descritte nelle procedure "5, 7" ed "8, 9, 10" sulla matrice "acqua" allo scopo di individuare un'opportuna soluzione per la routine analitica in ambito di accreditamento.

Materiali e Metodi

Lo studio retrospettivo ha previsto la conta di *Lpn* mediante filtrazione su membrana per campioni di acqua destinata al consumo umano. Dalla filtrazione di 1L di campione si passa al lavaggio di membrana bianca con 10ml di campione in provetta immersa in bagno ad ultrasuoni per 5 minuti successiva semina per spatolamento del concentrato non trattato (NT), trattato termico (TT) ed acqua (TA) su BCYE e GVPC. Sono stati selezionati 64 campioni risultati positivi nel range 100-1000 UFC/mL vs. BCYE e GVPC. Sono stati selezionati 50 campioni risultati positivi in 50 campioni selezionati su BCYE e GVPC. Dopo conservazione a 2-6°C per 4 giorni, i residui TA su GVPC.

Risultati

Sono risultati positivi 369/1594 campioni filtrati su membrana bianca. La conta più alta nel range dei positivi si è registrata su GVPC-NT; nei restanti 4 positivi è stata determinata su GVPC-TT (+0,3 LOG(UFC/L)) vs. GVPC-NT. Per tutti i campioni filtrati su membrana nera si è verificata la sovracrescita di microrganismi interferenti su BCYE-NT, in 10 casi anche su GVPC-TA. *Lpn* sovracrescita non è cresciuta in 4 GVPC-TA; è risultata contabile e con interferenti in 9 casi; nei rimanenti 41 GVPC-TA si è rilevata la presenza del solo target. Si sono confrontati perciò 50 risultati positivi i campioni rianalizzati. Il recupero maggiore si osserva in 37 casi su GVPC-NT: 5 conte $\geq +1,0$ I (UFC/L) vs. GVPC-TA, nei restanti 13 casi, come su GVPC-TA $\leq +0,8$ LOG(UFC/L) vs. GVPC-NT.

Conclusioni

In linea con la letteratura, questo studio consente di affermare che in acque a bassa concentrazione di *Lpn* interferenti il BCYE è illeggibile per posa diretta della membrana e non determina la conta di *Lpn* lavaggio della membrana dopo filtrazione. Il GVPC-NT stabilisce l'esito finale in entrambe le tecniche di recupero minore con GVPC-TA nei campioni rianalizzati farebbe pensare che la combinazione terreno selettivo riduca la crescita del target. Una matrice dell'allegato J può essere inglobata in un'utilizzando più metodi di trattamento, sulla base dell'esperienza del laboratorio: si può dichiarare le acque a bassa concentrazione di interferenti siano assimilabili alla matrice "B". I campioni analizzati escluse le acque con concentrazione estremamente elevata di interferenti, possono essere analizzate mediante filtrazione, lavaggio della membrana e semina di NT, TT e TA su un totale di 3 GVPC.