

La contaminazione *indoor* da *Legionella* spp: risultati preliminari di una indagine multicentrica italiana

Legionella spp. contamination in indoor air: preliminary results of an Italian multicenter study

Maria Teresa Montagna,¹ Osvalda De Giglio,¹ Christian Napoli,¹ Lucia Cannova,² Maria Luisa Cristina,³ Maria Grazia Deriu,⁴ Santi Antonino Delia,⁵ Ada Giuliano,⁶ Marco Guida,⁷ Pasqualina Laganà,⁵ Giorgio Liguori,⁸ Ida Mura,⁴ Francesca Pennino,⁹ Angelo Rossini,¹⁰ Stefano Tardivo,¹¹ Ida Torre,⁹ Maria Valeria Torregrossa,² Maria Rosaria Villafrate,¹² Roberto Albertini,¹³ Cesira Pasquarella¹⁴

¹Dipartimento di scienze biomediche e oncologia umana, Sezione di igiene, Università degli studi di Bari "Aldo Moro";

²Dipartimento di scienze per la promozione della salute, Sezione di igiene, Università degli studi di Palermo;

³Dipartimento di scienze della salute, Università degli studi di Genova; ⁴Dipartimento di scienze biomediche, Sezione di igiene, Università degli studi di Sassari; ⁵Dipartimento di scienze biomediche e delle immagini morfologiche e funzionali, Università degli studi di Messina; ⁶Dipartimento di prevenzione, servizio di igiene e sanità pubblica, Azienda sanitaria locale Salerno; ⁷Dipartimento di biologia, Università degli studi di Napoli "Federico II"; ⁸Dipartimento di scienze motorie e del benessere, Università "Parthenope", Napoli; ⁹Dipartimento di sanità pubblica, Università degli studi di Napoli "Federico II"; ¹⁰Istituto di ricovero e cura a carattere scientifico, Fondazione Santa Lucia, Roma; ¹¹Dipartimento di sanità pubblica e medicina di comunità, Università degli studi di Verona; ¹²Unità operativa "Controllo igiene ospedaliera", Azienda ospedaliera universitaria Policlinico "P. Giaccone", Palermo; ¹³Dipartimento di medicina clinica e sperimentale, Università degli studi di Parma, UO clinica e immunologia medica, Azienda ospedaliero-universitaria di Parma, Presidente dell'Associazione italiana di aerobiologia; ¹⁴Dipartimento di scienze biomediche, biotecnologiche e traslazionali, Università degli studi di Parma, Coordinatore nazionale GISIO-SItI (Gruppo Italiano Studio Igiene Ospedaliera – Società Italiana di Igiene, Medicina Preventiva e Sanità Pubblica).

Corrispondenza: Maria Teresa Montagna; e-mail: igiene.dimo@uniba.it

Riassunto

Obiettivo. Rilevare la presenza di *Legionella* spp. nell'aria attraverso un protocollo standardizzato, a fianco dei tradizionali metodi impiegati per la rete idrica.

Disegno. In dieci strutture sanitarie è stato selezionato un bagno, la cui acqua presentava una contaminazione da *Legionella* >1.000 unità formanti colonie (ufc)/litro. La contaminazione dell'aria è stata valutata tramite campionamento attivo (*Surface Air System*, SAS) e passivo, impiegando piastre di sedimentazione per la valutazione dell'Indice Microbico Aria (*Index of Microbial Air*, IMA). I campionamenti sono stati effettuati per 8 ore consecutive, a circa 1 m dal pavimento e a 50 cm dal rubinetto. Con il campionamento attivo, 200 litri di aria erano aspirati ogni 12 min, dopo flussaggio dell'acqua per 2 min. Il valore IMA era calcolato come valore medio di ufc/16 piastre esposte nel corso del campionamento (due per ogni ora). La contaminazione dell'acqua è stata valutata al tempo zero, dopo 4 e 8 ore, secondo le procedure descritte nelle linee guida del 2000.

Risultati. *Legionella* spp. è stata rilevata nell'aria di tre strutture sanitarie (in una con il metodo SAS, in due con il metodo IMA), la cui contaminazione idrica è risultata compresa tra 1.100 e 43.000 ufc/l (mediana=40.000). I restanti sette ospedali hanno riportato una contaminazione da *Legionella* solo nell'acqua (mediana=8.000; range 1.200-70.000 ufc/l), mai nell'aria circostante.

Conclusioni. I nostri dati suggeriscono che la valutazione della contaminazione ambientale da *Legionella* spp, quando effettuata esclusivamente attraverso il campionamento dell'aria, può portare a una sottostima del rischio, anche in presenza di un elevato grado di contaminazione idrica.

(*Epidemiol Prev* 2014; 38(6) Suppl 2: 62-65)

Parole chiave: *Legionella*, aria, acqua, SAS, IMA

Abstract

Objective. To propose a standardized protocol for the evaluation of *Legionella* contamination in air.

Design. A bathroom having a *Legionella* contamination in water >1,000 cfu/l was selected in 10 different healthcare facilities. Air contamination was assessed by active (*Surface Air System*, SAS) and passive (*Index of Microbial Air*, IMA) sampling

for 8 hours, about 1 m away from the floor and 50 cm from the tap water. Two hundred liters of air were sampled by SAS every 12 min, after flushing water for 2 min. The IMA value was calculated as the mean value of colony forming units/16 plates exposed during sampling (2 plates/hour). Water contamination was evaluated at T_0 , after 4 and 8 hours, according to the standard methods.

Results. Air contamination by *Legionella* was found in three healthcare facilities (one with active and two with passive sampling), showing a concomitant tap water contamination (median=40,000; range 1,100-43,000 cfu/l). The remaining seven hospitals isolated *Legionella* spp. exclusively from water samples (median=8,000; range 1,200-70,000 cfu/l).

Conclusions. Our data suggest that environmental *Legionella* contamination cannot be assessed only through the air sampling, even in the presence of an important water contamination.

(*Epidemiol Prev* 2014; 38(6) Suppl 2: 62-65)

Key words: *Legionella*, air, water, SAS, IMA

INTRODUZIONE

Legionella spp. è un microrganismo intracellulare che vive in ambienti acquatici naturali (fiumi, laghi, stagni) e artificiali (rubinetti, docce, idromassaggi, torri di raffreddamento, apparecchi medicali ecc.) e predilige una temperatura compresa tra 25°C e 42°C, soprattutto se l'acqua è stagnante e ricca di sedimenti.¹

La malattia si trasmette attraverso l'inalazione di aerosol contaminato; fattori individuali e patologie predisponenti sono alla base della diversa suscettibilità dell'ospite esposto alla medesima fonte di contagio.²

Delle 58 specie e 70 sierogruppi (sg) attualmente noti, *Legionella pneumophila* sg1 e sg6 risultano i principali responsabili di malattia nell'uomo.³ Oltre alle comuni specie di *Legionella* un tempo ritenute ambientali e già da tempo associate a casi umani, di recente sono state identificate ulteriori specie (*L. cardiaca*, *L. nagasakiensis*, *L. steelei*) in pazienti immunocompromessi affetti da legionellosi.⁴⁻⁶

La legionellosi è sottoposta a sistemi speciali di sorveglianza sia internazionale sia nazionale. In Europa, è attivo l'European Legionella disease network (ELDSnet), un sistema coordinato dall'European Centre for Disease Control and Prevention (ECDC) di Stoccolma che raccoglie informazioni sui casi di legionellosi associati a viaggi e turismo. In Italia, il sistema nazionale di sorveglianza è stato istituito nel 1983 e dal 1990 la malattia rientra tra quelle infettive e diffuse di classe II, per le quali sussiste obbligo di notifica.

I documenti nazionali relativi al controllo e prevenzione della legionellosi⁷ prevedono il campionamento di matrici ambientali (acqua, incrostazioni, depositi, superfici ecc.) ma non dell'aria, sebbene negli anni successivi alcuni autori abbiano evidenziato la presenza di *Legionella* nell'aria indoor e outdoor.^{8,9} Probabilmente, la scelta di prediligere i controlli sulla rete idrica, rispetto ad altre matrici ambientali, trova il suo razionale nelle caratteristiche ecologiche del microrganismo che, colonizzando gli ambienti acquatici, permette in tal modo di risalire alla sorgente di infezione. Inoltre, essendo stata dimostrata una estrema variabilità delle cariche di *Legionella* spp. nelle reti idriche,¹⁰ potrebbe verificarsi che basse concentrazioni del microrganismo nelle acque non siano rilevate con il campionamento dell'aria.¹¹ Infatti, in alcune indagini effettuate in occasione di eventi epidemici correlati a torri di raffreddamento,

alcuni autori hanno campionato l'acqua di condensa piuttosto che l'aria circostante.¹²

Considerato che anche in letteratura sono indicate le oggettive difficoltà legate alla determinazione di *Legionella* spp. nell'aria¹³ e alle diverse modalità di campionamento,^{11,14-16} questo studio si propone di standardizzare un protocollo di campionamento dell'aria che consenta di rilevare la presenza di *Legionella* aerodispersa quando nell'ambiente circostante è presente una rete idrica contaminata. Inoltre, il confronto con i risultati del classico campionamento dell'acqua permetterà di valutare anche l'attendibilità del campionamento dell'aria in corso di indagini epidemiologiche.

MATERIALI E METODI

Disegno dello studio

Sono stati arruolati 10 ospedali distribuiti a livello nazionale. Ciascuna sede ha identificato un bagno che presentava una contaminazione idrica da *Legionella* spp. >1.000 ufc/l.

Il protocollo di studio prevedeva tre fasi:

- campionamento dell'acqua e dell'aria circostante;
- isolamento, identificazione e conservazione dei ceppi;
- analisi dei risultati.

Campionamento dell'acqua e dell'aria

Una volta identificato il bagno, sono state rilevate le sue dimensioni e il numero di porte e finestre presenti, quindi si è proceduto al campionamento dell'aria e, in parallelo, della corrispondente fonte di acqua, avendo cura di tenere chiusi porte, finestre e altri rubinetti presenti nel bagno. Inoltre, sono state registrate eventuali aperture della porta di ingresso.

Campionamento dell'aria

La contaminazione dell'aria è stata valutata mediante campionamento attivo e passivo¹⁷ per un periodo complessivo di 8 ore (dalle 9.00 alle 17.00).

Il campionamento attivo è stato effettuato tramite *surface air system* (SAS, International PBI, Milano, Italia), collocato a 1 m da terra e a 50 cm dal rubinetto. La portata è stata impostata a 180 l/min, seguendo un cronoprogramma prefissato: ogni 12 minuti, previo flussaggio dell'acqua per due minuti, sono stati aspirati 200 l di aria, per un totale di 1.000 l/h, avendo cura di cambiare la piastra al termine di ciascuna ora di campiona-

mento. Complessivamente, sono state effettuate 40 aspirazioni su un totale di 8 piastre (5 aspirazioni/piastra/h). Il numero delle colonie presenti su ogni piastra è stato calcolato in base alla tabella di conversione fornita dalla ditta produttrice ed espresso in ufc/m³.

Il campionamento passivo è stato effettuato utilizzando piastre di sedimentazione (diametro: 9 cm) per la determinazione dell'Indice Microbico Aria (IMA).¹⁸ Due piastre/h sono state poste a 1 m dal pavimento e a 50 cm dal rubinetto selezionato. Il risultato è stato ricavato dalla media dei valori rilevati sulle 16 piastre/8 h ed espresso in unità formanti colonie (ufc)/piastra.

Campionamento dell'acqua

Nell'arco delle otto ore previste dal protocollo di studio l'acqua calda del rubinetto è stata campionata tre volte: T₀, prima di avviare il primo campionamento dell'aria; T₁, dopo 4 ore; T₂, dopo 8 ore dal termine del campionamento dell'aria.

La ricerca di *Legionella* spp. è stata eseguita secondo quanto riportato nelle Linee guida per la prevenzione e controllo della legionellosi.⁷

Isolamento, identificazione e conservazione di *Legionella* spp.

Per l'isolamento di *Legionella* spp. sono state utilizzate piastre contenenti GVPC (Glycine-Vancomycin-Polymyxin-Cycloheximide medium, Liofilchem Srl, Teramo, Italia). Dopo incubazione a 36°C per 10 giorni in ambiente umido e CO₂ al 2,5%, le colonie sospette sono state sottocoltivate su CYE (Charcoal Yeast Extract medium, Liofilchem Srl, Teramo, Italia) e BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract medium, Liofilchem Srl, Teramo, Italia); quelle ascrivibili al genere *Legionella* sono state sottoposte a identificazione tramite antisieri polivalenti (Oxoid Spa, Milano, Italia).

Dopo tipizzazione sierologica, i ceppi isolati sono stati congelati a -80°C secondo due modalità: il ceppo di fresco isolamento è stato stemperato sia in 1,5 ml di latte scremato sterile sia in 0,2 ml di glicerolo + 1,8 ml di acqua distillata. Sono stati impiegati entrambi i metodi in quanto la sopravvivenza dei ceppi può essere condizionata dalla modalità di conservazione.

RISULTATI

L. pneumophila sg2-14 è stata rilevata nell'aria e nell'acqua di tre dei 10 bagni esaminati: il primo, positivo con il campionamento passivo (1 ufc/piastra), presentava una contaminazione idrica pari a 1.100 ufc/l (T₀), 400 ufc/l (T₁), 800 ufc/l (T₂); il secondo, positivo con il campionamento passivo (1,85 ufc/piastra), presentava una contaminazione idrica pari a 40.000 ufc/l (T₀), 500 ufc/l (T₁), 700 ufc/l (T₂); il terzo, positivo con il campionamento attivo (2 ufc/m³), presentava una contaminazione idrica pari a 43.000 ufc/l (T₀), 140.000 ufc/l (T₁), 160.000 ufc/l (T₂).

Nei restanti sette bagni *L. pneumophila* sg1 e sg2-14 sono state riscontrate solo nell'acqua di rubinetto con valori mediani di contaminazione pari a 6.800 ufc/l (T₀, range 1.200-12.000); 1.900 ufc/l (T₁, range 100-6.700); 1.200 ufc/l (T₂, range 0-6.400).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le oggettive difficoltà nel rilevare la presenza di *Legionella* spp. in campioni di aria sono già ampiamente descritte in letteratura e sono in relazione alla possibile contaminazione delle piastre da parte di batteri o miceti.¹³ Infatti, nonostante si faccia uso di terreni selettivi, il mancato trattamento al calore, solitamente impiegato quando si analizzano i campioni di acqua, può favorire la riproduzione di altre specie batteriche, inibendo la crescita di *Legionella* spp. In particolare, è nota l'attività antagonista di *Pseudomonas aeruginosa* su *Legionella* spp.¹⁹

Nel nostro studio, la contemporanea contaminazione batterica e/o micotica non ha impedito la rilevazione di *Legionella*, sia nei campioni di aria positivi sia nei campioni di acqua. Inoltre, il grado di contaminazione della rete idrica da *Legionella* non appare direttamente proporzionale alla contaminazione dell'aria. Sebbene alcuni autori abbiano riportato che basse concentrazioni di *Legionella* spp. nelle acque non sono rilevabili con il campionamento dell'aria,^{9,11} nel nostro caso la presenza di *Legionella* nell'aria è stata rilevata anche con una contemporanea contaminazione idrica pari a 400 ufc/l.

Per quanto riguarda i diversi metodi utilizzati per il campionamento dell'aria, alcuni autori hanno confrontato i valori delle conte microbiche ottenuti con il campionamento attivo e passivo (tramite SAS e piastre di sedimentazione), dimostrando che non sempre i dati sono sovrapponibili.¹⁴ A nostro avviso, i due sistemi non sono da ritenersi contrapposti, ma ciascuno deve essere preso in considerazione per i propri vantaggi e limiti e in relazione alle condizioni di utilizzo. Inoltre, nel nostro studio, nel bagno risultato positivo con il campionamento attivo l'apertura della porta non sembra aver influito sul riscontro di *Legionella* nell'aria.

In conclusione, i nostri dati suggeriscono che la valutazione della contaminazione ambientale da *Legionella* spp., quando effettuata esclusivamente attraverso il campionamento dell'aria, può portare a una sottostima del rischio, anche in presenza di un elevato grado di contaminazione idrica. Il campionamento dell'aria può essere un utile ausilio di indagine in corso di cluster epidemici, purché si effettui in parallelo un controllo della rete idrica. In attesa di perfezionare protocolli standardizzati e condivisi, valutando anche metodi alternativi di campionamento (es: gorgogliamento, filtrazione ecc.), saranno condotti studi molecolari sui ceppi isolati dall'aria e dall'acqua.

Conflitti di interesse: nessuno

Bibliografia/References

1. Napoli C, Fasano F, Iatta R et al. *Legionella* spp. and legionellosis in south-eastern Italy: disease epidemiology and environmental surveillance in community and health care facilities. *BMC Public Health* 2010;10:660.
2. Fonseca MV, Swanson MS. Nutrient salvaging and metabolism by the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Front Cell Infect Microbiol* 2014; 4:12.
3. Messi P, Bargellini A, Anacarso I et al. Protozoa and human macrophages infection by *Legionella pneumophila* environmental strains belonging to different serogroups. *Arch Microbiol* 2012;195(2):89-96.
4. Pearce MM, Theodoropoulos N, Mandel MJ et al. *Legionella cardiaca* sp. nov., isolated from a case of native valve endocarditis in a human heart. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012;62(Pt 12):2946-54.
5. Yang G, Benson RF, Ratcliff RM et al. *Legionella nagasakiensis* sp. nov., isolated from water samples and from a patient with pneumonia. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012;62(Pt 2):284-88.
6. Edelstein PH, Edelstein MA, Shephard LJ et al. *Legionella steelei* sp. nov., isolated from human respiratory specimens in California, USA, and South Australia. *Int J Syst Evol Microbiol* 2012;62(Pt 8):1766-71.
7. *Linee guida nazionali per la prevenzione e il controllo della legionellosi*. GU n.103 del 5.5.2000.
8. Crimi P, Macrina G, Grieco A et al. Correlation between *Legionella* contamination in water and surrounding air. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006;27(7): 771-73.
9. Palmore TN, Stock F, White M et al. A cluster of cases of nosocomial legionnaires disease linked to a contaminated hospital decorative water fountain. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009;30:764-68.
10. Napoli C, Iatta R, Fasano F et al. Variable bacterial load of *Legionella* spp. in a hospital water system. *Sci Total Environ* 2009;408:242-44.
11. Pasquarella C, Veronesi L, Castiglia P et al. Italian multicentre study on microbial environmental contamination in dental clinics: a pilot study. *Sci Total Environ* 2010; 408:4045-51.
12. McCormick D, Thorn S, Milne D et al. Public health response to an outbreak of Legionnaires' disease in Edinburgh, United Kingdom, June 2012. *Euro Surveill* 2012;17(28):pii=20216.
13. Chang CW, Chou FC. Methodologies for quantifying culturable, viable, and total *Legionella pneumophila* in indoor air. *Indoor Air* 2011; 21:291-99.
14. Napoli C, Marcotrigiano V, Montagna MT. Air sampling procedures to evaluate microbial contamination: a comparison between active and passive methods in operating theatres. *BMC Public Health* 2012;12:594.
15. Pasquarella C, Veronesi L, Napoli C et al. Microbial environmental contamination in Italian dental clinics: A multicenter study yielding recommendations for standardized sampling methods and threshold values. *Sci Total Environ* 2012;420:289-99.
16. Pasquarella C, Albertini R, Dall'Aglio P et al. Air microbial sampling: the state of the art. *Ig Sanità Pubbl* 2008;64:79-120.
17. UNI EN ISO 14698-1: 2004. Camere bianche ed ambienti associati controllati - Controllo della biocontaminazione - Parte 1: principi generali e metodi.
18. Pasquarella C, Pitzurra O, Savino A. The index of microbial air contamination. *J Hosp Infect* 2000;46:241-56.
19. Kimura S, Tateda K, Ishii Y et al. *Pseudomonas aeruginosa* Las quorum sensing autoinducer suppresses growth and biofilm production in *Legionella* species. *Microbiology* 2009;155:1934-39.