



# FESTIVAL dell'ACQUA

## **LEGIONELLA: CERTEZZE E INCERTEZZE**

Angela Manenti, responsabile laboratorio  
Acquedotto di Milano MMSpa

VENEZIA, 10 ottobre 2019  
Laboratorio 4.0



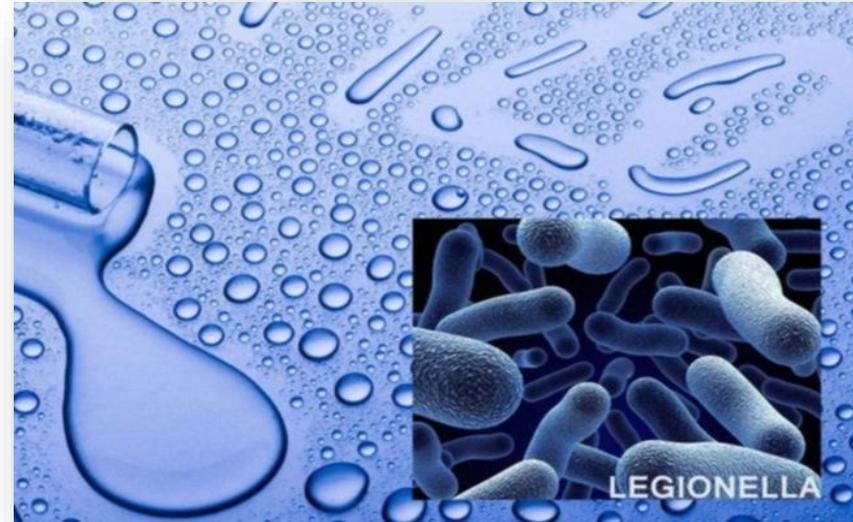
## SOMMARIO

- Legionella
- Diffusione nell'ambiente umano
- Fattori che favoriscono la formazione di Biofilm nelle reti idriche
- Cos'è il Biofilm?
- *Legionella pneumophila*
- Uno sguardo in Europa..
- Normative
- Valutazione del rischio
- Valutazione del rischio analitico
- Preparazione e risposta all'emergenza
- Progetti lavori in corso



# Legionella

- Classe  $\gamma$ -Proteo-batteri
- Bacilli Gram-negativi
- il Genere comprende 58 diverse specie
- 3 sottospecie
- Circa 70 sierogruppi
- Aerobi obbligati
- La maggior parte è dotata di flagelli

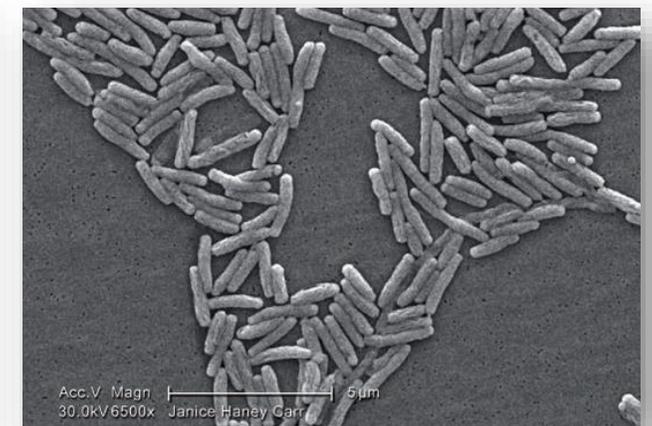


Ubiquitaria e ampiamente distribuita



Presente in ambienti acquatici naturali:

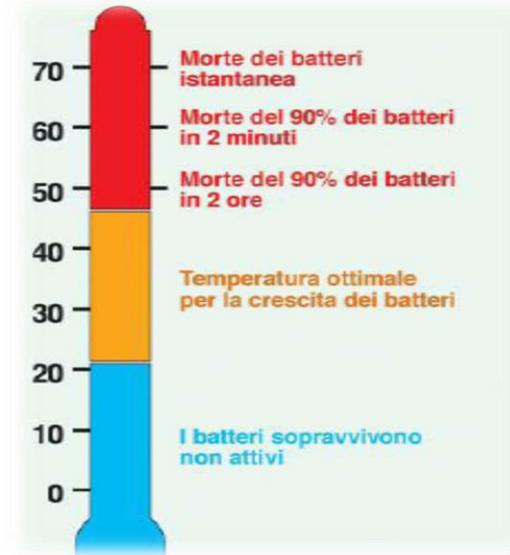
- Acque sorgive e termali
- Fiumi e laghi
- Stagni e ambienti umidi



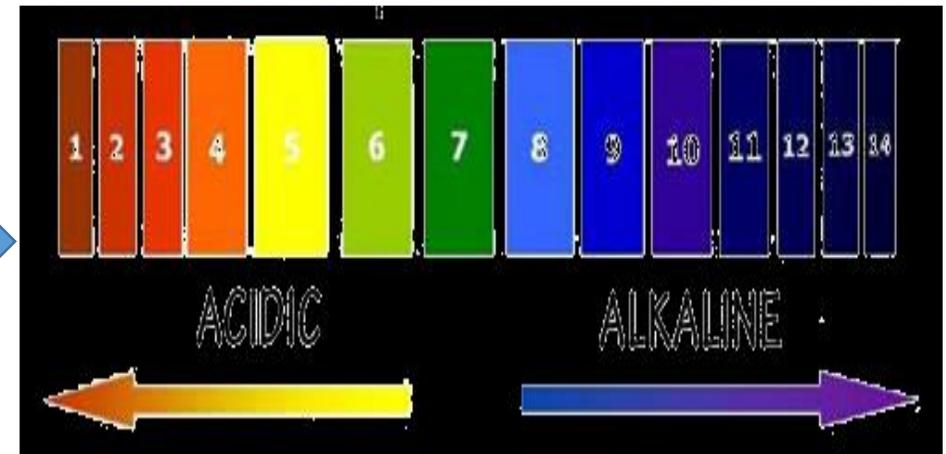


# Legionella

- può sopravvivere a basse °T per lunghi periodi per poi proliferare quando la temperatura raggiunge condizioni ottimali
- La temperatura ottimale di proliferazione è compresa fra i 20-45 °C
- A temperature superiori a 60 °C non sopravvive



- È acido tollerante e sopporta l'esposizione a pH = 2 per brevi periodi
- Sono state isolate Legionelle in sorgenti con pH = 2.7-9.3
- Per supportare la crescita batterica in terreni di coltura, il pH svolge un ruolo critico (pH 6.9)





# Diffusione nell' ambiente umano

La Legionella SPP è naturalmente presente nell'acqua.

Dagli ambienti naturali raggiunge quelli artificiali mediante le condotte idriche cittadine, soprattutto di grandi strutture con sistemi centralizzati di distribuzione dell'acqua calda:

- Ospedali
- Case di riposo
- Strutture ricettive
- Centri sportivi e termali
- Torri di raffreddamento
- Piscine e cisterne con acqua stagnante
- Fontane decorative

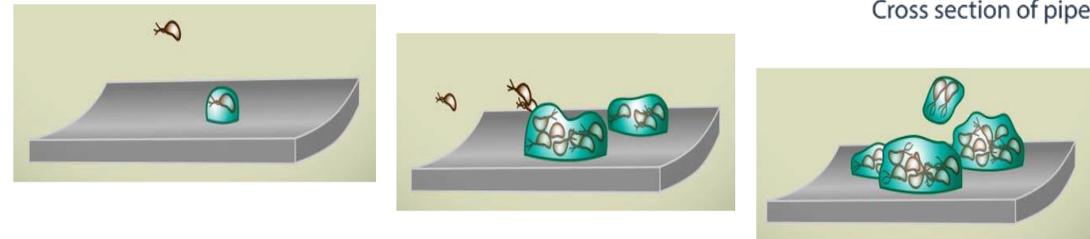
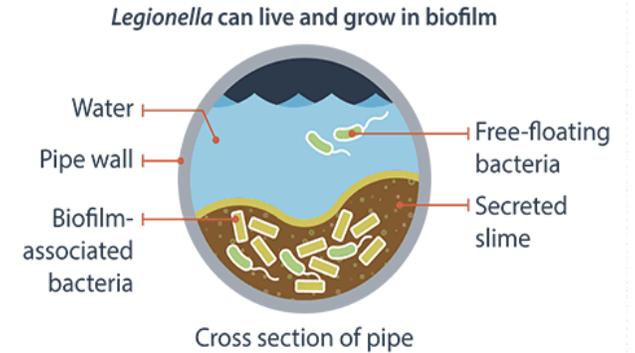




# Fattori che favoriscono la formazione di Biofilm nelle reti idriche

A causa dell'elevato rapporto superficie/volume della rete di distribuzione, la maggior parte (95%) del microbioma dell'acqua potabile risiede nel Biofilm

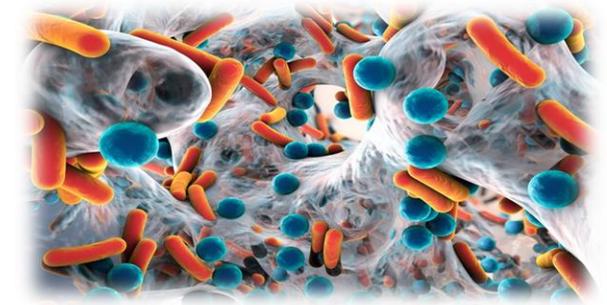
- Presenza di nutrienti provenienti dall'acqua e dai materiali a contatto con l'acqua
- Caratteristiche idrauliche degli impianti
- Presenza di incrostazioni (calcare e corrosione)
- Stagnazione o scarso flusso dell'acqua
- Bracci morti negli impianti idrici e nei serbatoi
- **Temperatura e pH dell'acqua**





# Cos'è il Biofilm?

Complessa comunità microbica costituita da cellule batteriche di specie diverse e matrice polimerica extracellulare (EPS) da loro prodotta



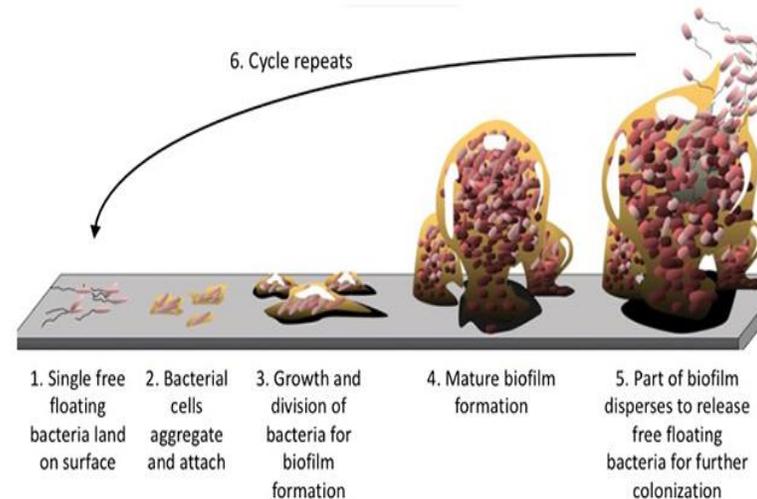
Il ciclo vitale del biofilm è costituito da 3 fasi principali:

- I batteri si fissano al substrato
- Maturazione del biofilm
- Distacco e dispersione dei batteri



Il biofilm è una struttura dinamica in continuo cambiamento:

- turbolenza
- disinfettanti/ossidanti



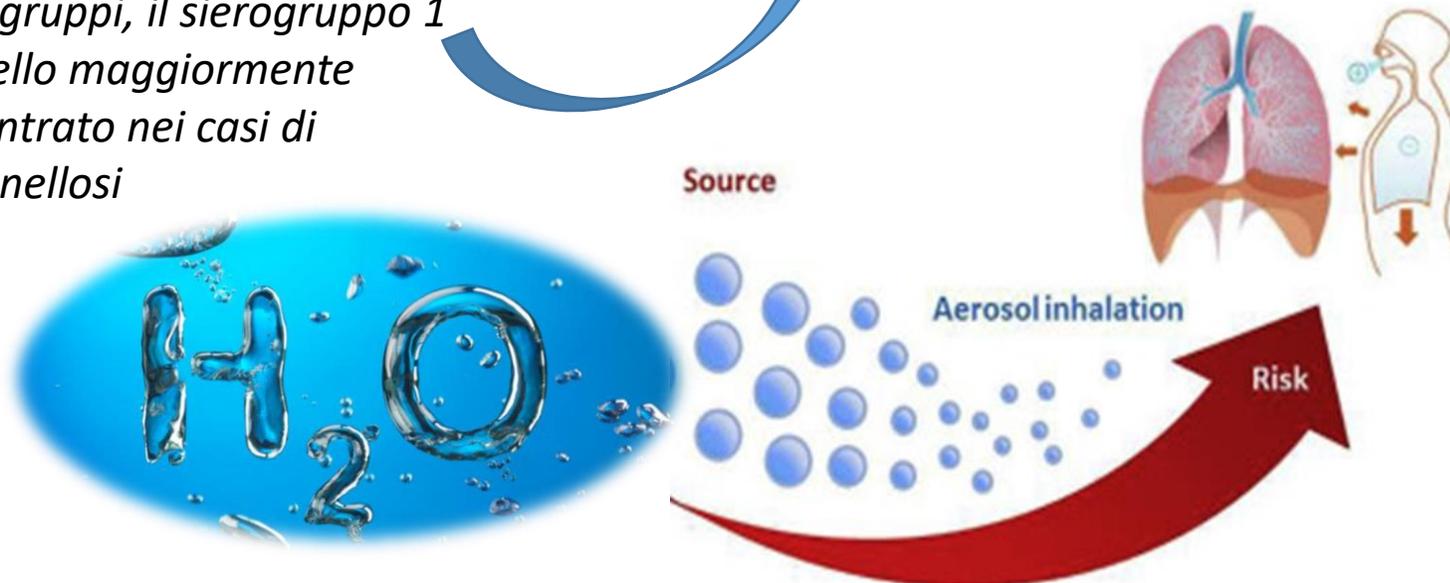
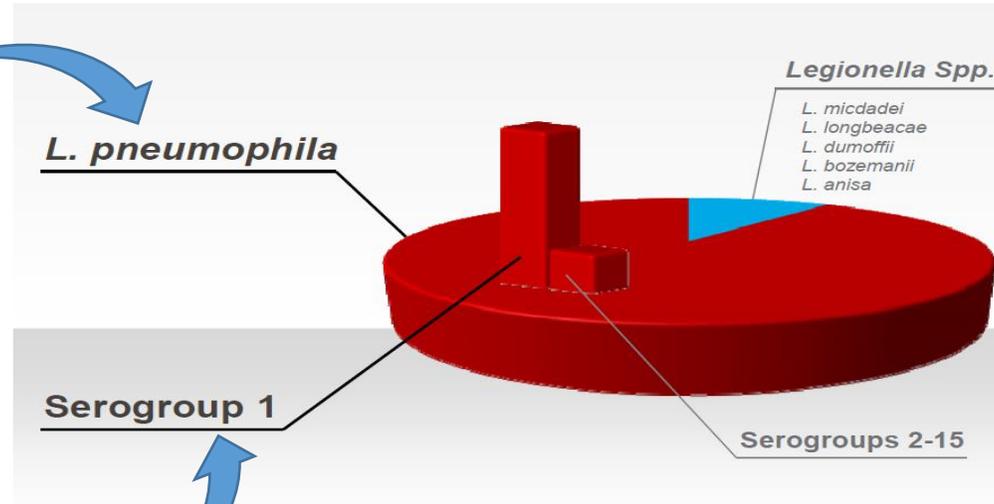
Il distacco dal biofilm può avvenire:

- Per erosione (rilascio delle cellule più esterne)
- Per distacco di grossi aggregati (sloughing) dovuto a sollecitazioni improvvise



# Legionella pneumophila

- Al genere Legionella appartengono più di 50 specie ma fra queste la più pericolosa per l'uomo è *L. pneumophila*
- Alla specie *L. pneumophila* appartengono 15 sierogruppi, il sierogruppo 1 è quello maggiormente riscontrato nei casi di legionellosi



# Uno sguardo in Europa..



Figure 1. Distribution of Legionnaires' disease cases per 100 000 population by country, EU/EEA, 2017

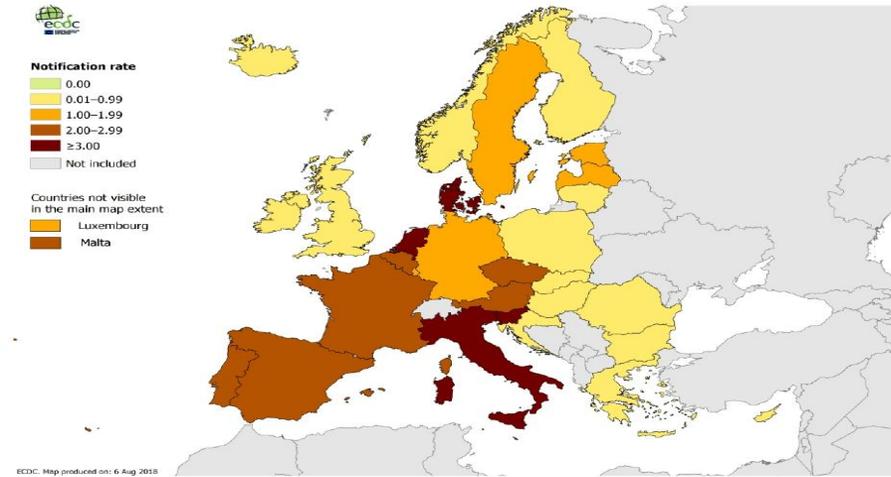
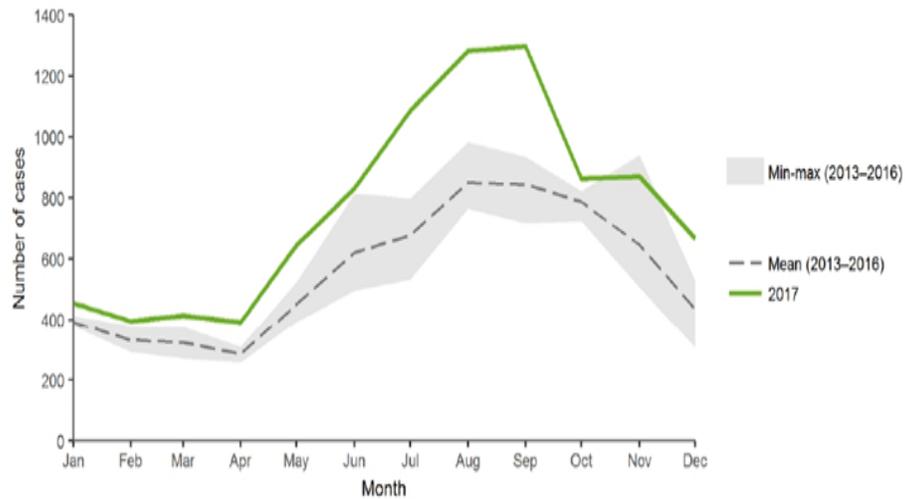


Figure 3. Distribution of Legionnaires' disease cases by month, EU/EEA, 2017 and 2013-2016



- La legionellosi è un'infezione respiratoria non comune e principalmente sporadica con un tasso di notifica complessivo nel 2017 per l'UE / SEE di **1,8 su 100.000 abitanti**
- Il tasso di notifica annuale è aumentato costantemente nel periodo 2013-2017: dall'1,2 nel 2013 all'1,8 nel 2017
- Nel 2017 il numero di casi è aumentato del **30%** rispetto al 2016
- Quattro paesi (Francia, Germania, Italia e Spagna) hanno rappresentato il **68%** di tutti i casi notificati nel 2017
- I maschi di età pari o superiore a 65 anni sono i più colpiti (7,0 su 100.000)



# Normativa Legionella

La legge italiana ha disciplinato la materia Legionella con una serie di linee guida ufficiali

- Le prevenzione e il controllo della Legionellosi (2000)
- Le indicazioni per i gestori di strutture turistico-ricettive e termali (2005)
- Le indicazioni per i laboratori di diagnosi microbiologica e controllo ambientale (2005)



Con la Conferenza Stato-Regioni (maggio 2015) le linee guida sono state riunite, aggiornate e integrate:  
**Linee guida per la prevenzione ed il controllo della Legionellosi (2015)**

Recentemente è stata varata una nuova «proposta di direttiva» dal parlamento europeo che prevederebbe la «Valutazione del rischio connesso alla distribuzione domestica» (Art. 10) - Monitoraggio di Piombo e **Legionella**





# PROTOCOLLO DI CONTROLLO DEL RISCHIO LEGIONELLOSI

Si divide in tre fasi sequenziali e correlate tra loro:

- **Valutazione del rischio:** indagine che individua le condizioni che collegano la presenza effettiva o potenziale di Legionella negli impianti alla possibilità di contrarre l'infezione
- **Gestione del rischio:** tutti gli interventi e le procedure volte a rimuovere definitivamente o a contenere costantemente le criticità individuate nella fase precedente
- **Comunicazione del rischio:** azioni finalizzate a informare, formare, sensibilizzare i soggetti interessati dal rischio potenziale

*«È necessario che il Protocollo venga applicato in ogni struttura (sia civile sia industriale) nel quale siano presenti impianti potenzialmente a rischio legionellosi»*

*La Legionella, infatti, è un batterio ubiquitario e, quindi, il suo ritrovamento in un sito ambientale non è correlabile in maniera univoca al caso, a meno che gli accertamenti di biologia molecolare non evidenzino un alto grado di omologia con il ceppo isolato dal malato*

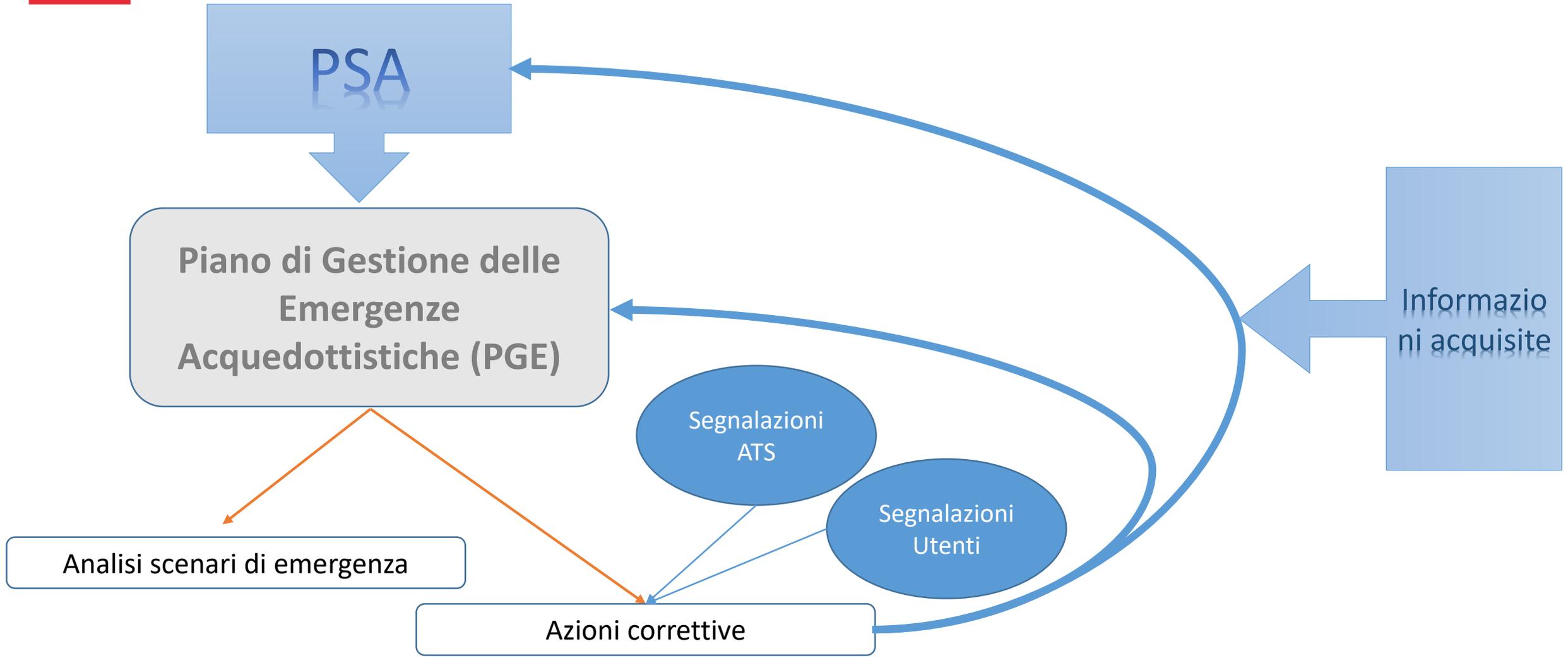


...e intanto a Milano...  
fervono i lavori

---



# Preparazione e risposta all'emergenza





Segnalazione da parte di uno o più utenti



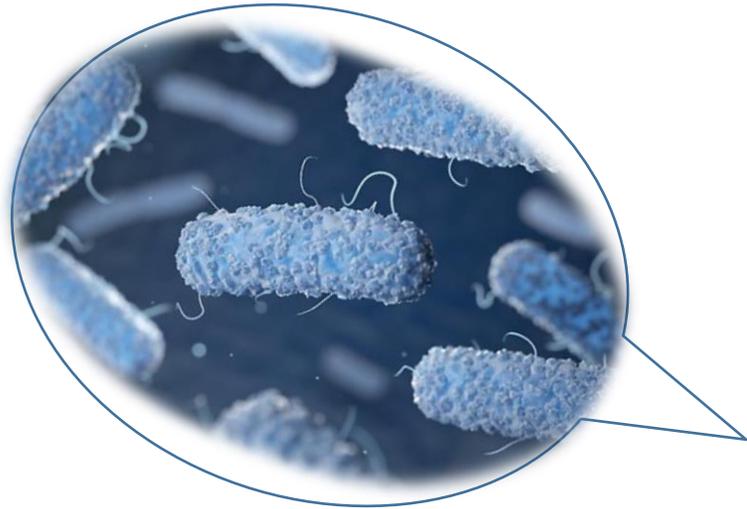
**Laboratorio:**  
predisposizione piano di controllo



Prelievo: al rubinetto contatore; al rubinetto della Centrale attiva; alla fontanella prossima alla abitazione da cui è partita la segnalazione



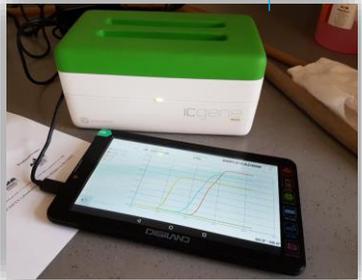
**ANALISI**



Tecnica classica ISO 11731



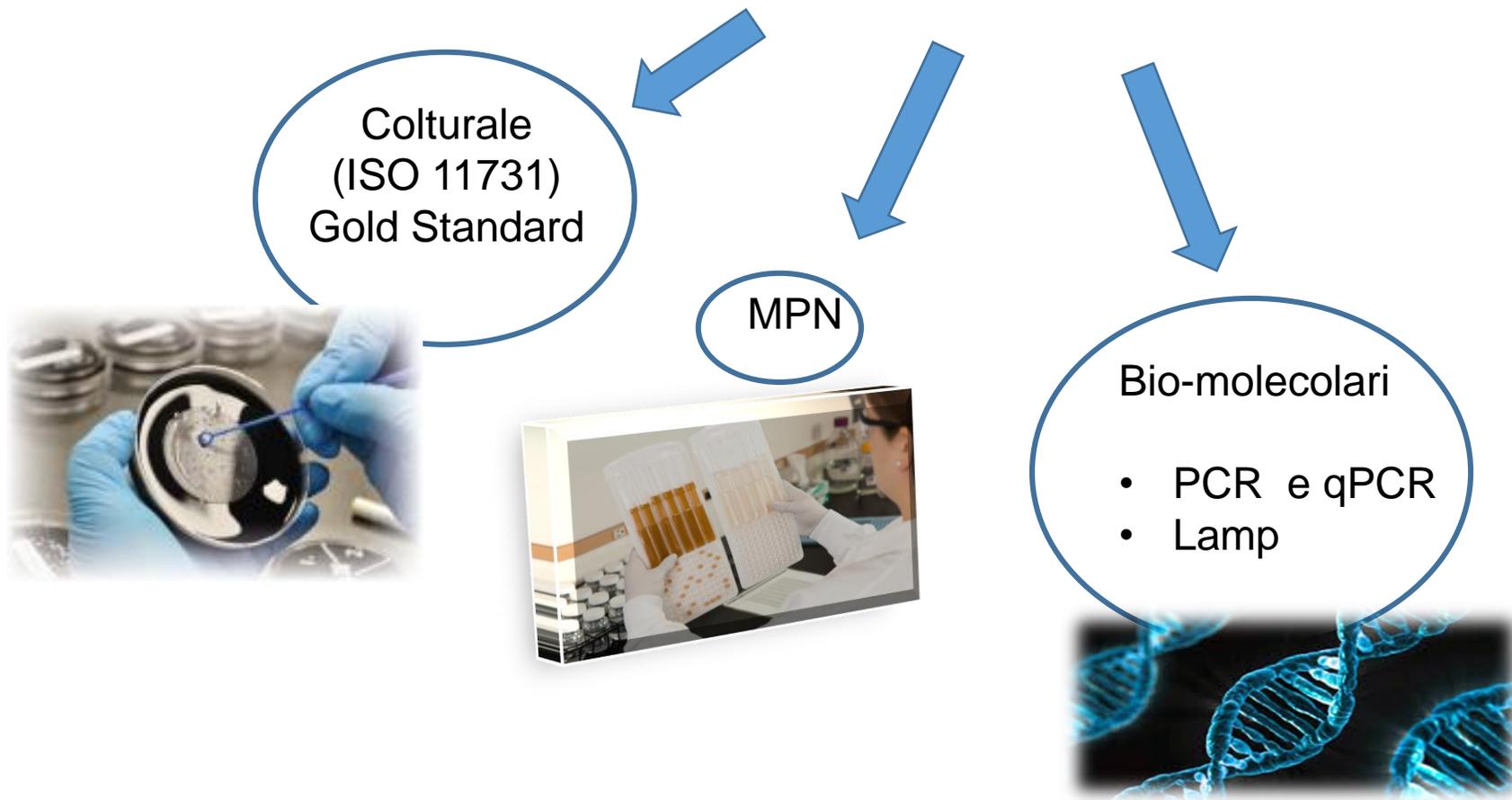
MPN Legiolert



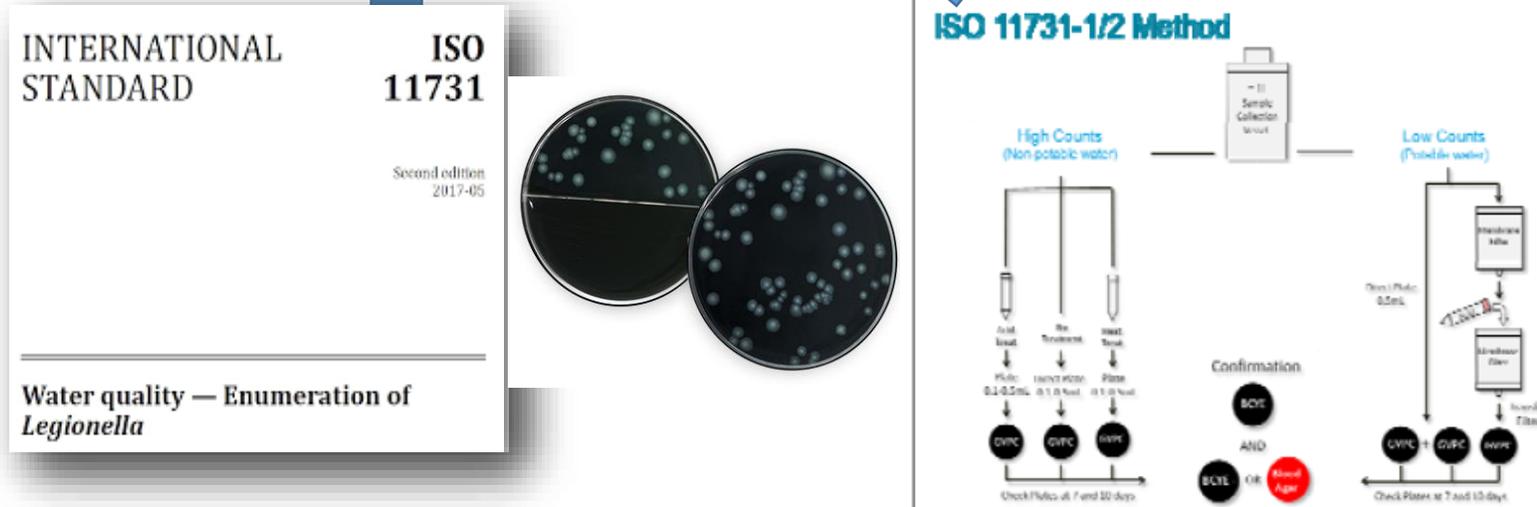
Tecnica Lamp (analisi molecolare)

# Tecniche analitiche

Sono diverse le tipologie di metodi analitici applicabili per la ricerca di Legionella nelle acque potabili:



# La metodica classica (ISO 11731)



- Metodo Ufficiale Internazionale
- Risultati in UFC
- Relativamente facile esecuzione
- Non necessita di strumentazione complessa

## Limiti del metodo

- Diverse matrici e possibilità di esecuzione dell'analisi (campione incognito?)
- Diverse modalità selettive e terreni colturali (BCYE, GVPC, MWY)
- Eventuali Pre-trattamenti acidi o con calore del campione
- Necessarie conferme analitiche
- **Tempistiche di risposta elevate: almeno 10-12 giorni**

Segnalazione  
inefficace in caso di  
emergenza



# MPN – Legiolert



Basato sul rilevamento di un enzima specifico di *L. pneumophila* mediante l'utilizzo di un particolare substrato in grado di produrre una colorazione marrone in caso di positività



- Specifico per *Legionella pneumophila*
- Più rapido del metodo tradizionale
- Quantifica da 1 fino a 2272 MPN in 100 mL
- Semplice da utilizzare
- Fornisce risultati definitivi senza necessità di prove di conferma
- Certificato di validazione NF di AFNOR

## Limiti:

- Solo *L. pneumophila*
- Volume di 100 mL
- Necessita di incubazione (7gg)

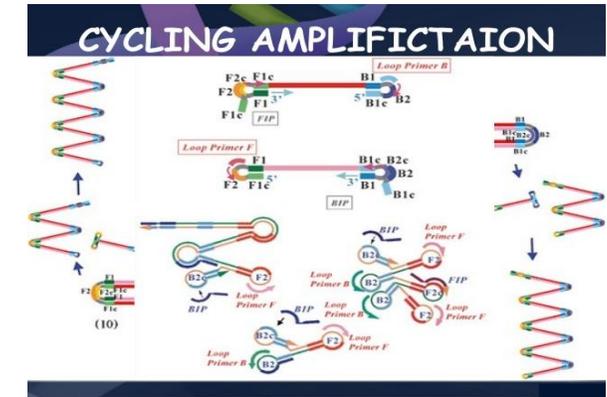
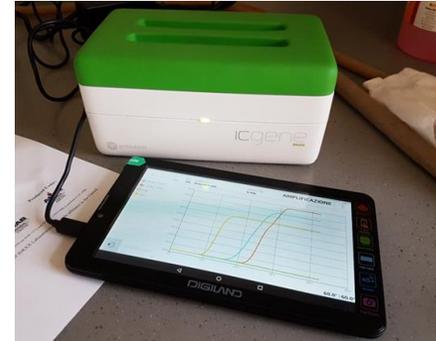


# Tecnica LAMP

La LAMP è una tecnologia che si basa sull'amplificazione isoterma del DNA

- Polimerasi termostabile (60 - 65 °C)
- 6 Primer specifici

Rilevazione della fluorescenza emessa dal campione in tempo reale e interpretazione automatica del risultato finale con la formazione di curve sigmoidi



## Vantaggi

- Brevi tempi analitici e risultati entro poche ore
- Elevata specificità
- Rileva sia *L. pneumophila*, sia *Legionella* spp.
- Facile utilizzo con Kit già pronti
- Non necessita di strumentazione costosa (es: termociclatori)

## Limiti

- Solo analisi qualitative
- Nessuna validazione internazionale
- Non discrimina le Legionelle vitali da quelle non coltivabili o morte
- Relativamente alto LOD



*PRESENTAZIONE*

## LINEE GUIDA PER IL CONTROLLO DELLA LEGIONELLA IN IMPIANTI IDRAULICI CONDOMINIALI

Centrale dell'Acqua Milano - Piazza Diocleziano 5

EVENTO A INGRESSO LIBERO  
FINO A ESAURIMENTO POSTI

Legionella: cos'è, quali effetti ha sull'uomo e come affrontare al meglio eventuali criticità. MM Spa, in collaborazione con il Dipartimento di Ingegneria Civile e Ambientale del Politecnico di Milano, ha realizzato un vademecum di linee guida per aiutare concretamente gli amministratori di condominio e i gestori di comunità nella pianificazione di una corretta profilassi e manutenzione. Al termine dell'incontro verrà distribuito il manuale con le regole d'oro da seguire per una buona gestione del rischio e il programma di corsi di formazione ad hoc.

Venerdì 15 febbraio 2019, 14:30-16:30



POLITECNICO  
MILANO 1863

DIPARTIMENTO DI  
INGEGNERIA CIVILE E AMBIENTALE



Un sentito  
ringraziamento  
ai colleghi del laboratorio

*Grazie per l'attenzione*

