



arpav

# **Legionella: ecologia microbica e contaminazione ambientale**

**Gloria Bandettini - U.O. Biologia di Base  
Dipartimento Regionale Laboratori  
Servizio Laboratorio Provinciale di Padova**



## Legionella: classificazione

- **Famiglia:** Legionellaceae
- **Genere:** Legionella
- **Specie:** L. pneumophila (di cui si conoscono 15 sierogruppi) e altre 47 specie

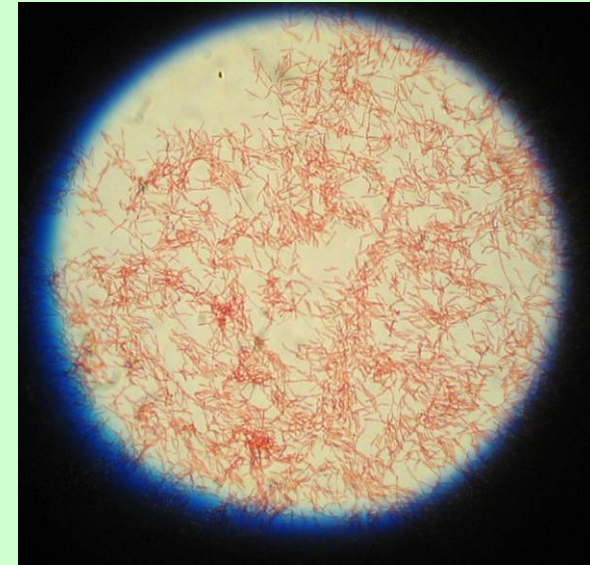
### L. pneumophila:

- **Responsabile del 95% dei casi di legionellosi**
- **Sierogruppi più patogeni:** s. 1 (implicato in circa 85% dei casi), s. 4, s. 6



## Legionella: cenni di biologia

- **Microrganismo aerobio**
- **Asporigeno, acapsulato**
- **Gram-negativo**
- **Forma bastoncellare o coccobacillare**
- **Generalmente mobile (dotato di un flagello polare)**
- **Dimensioni: larghezza  $0.3 \div 0.9 \mu\text{m}$ , lunghezza  $2 \div 4 \mu\text{m}$**





## Legionella: ecologia

La conoscenza dell'ecologia microbica aiuta a capire cosa favorisce la sopravvivenza e la crescita di Legionella nel suo ambiente naturale, dove l'acqua rappresenta il serbatoio principale.

Legionella è in grado di sopravvivere ad un ampio range di condizioni ambientali.

### pH

- Legionella è acido tollerante (può sopravvivere per brevi periodi a pH 2)
- isolata da sorgenti ambientali ad un range compreso tra 2.7÷8.3
- pH ottimale di crescita 6.85÷6.95



# Temperatura

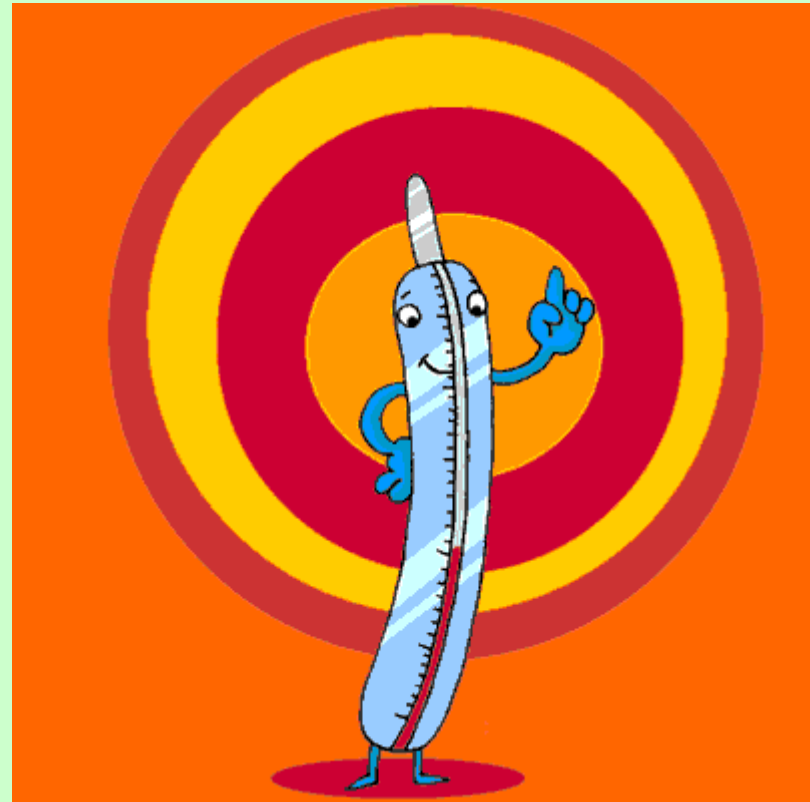
Legionella può sopravvivere e moltiplicarsi in ambiente acquatico tra 20° e 45°C.

Temperatura ottimale:  
32÷42°C

Più comunemente isolata in acque tra i 35 e i 45°C.

Non è in grado di moltiplicarsi al di sotto dei 20°C.

Non è in grado di sopravvivere a temperatura superiore ai 60°C.





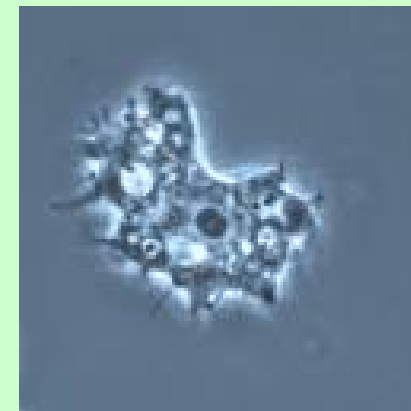
## Interazione con altri microrganismi:

Legionella sopravvive e si moltiplica in ambiente acquatico come parassita intracellulare di protozoi e muffe, che sono fonte di nutrimento e di protezione da condizioni ambientali sfavorevoli

14 specie di protozoi:

amebe (*Acanthamoeba*, *Naegleria* e *Hartmanella* spp), ciliati (*Tetrahymena pyriformis*, *Tetrahymena vorax*)

1 specie di muffa gelatinosa.





Legionella viene fagocitata dai protozoi (amebe e ciliati); dopo l'ingestione, la sopravvivenza del microrganismo dipende dalla temperatura dell'acqua: a 22°C i batteri vengono digeriti, a 35°C possono moltiplicarsi all'interno dei protozoi.

Legionella può sopravvivere incistata all'interno dei protozoi : è stato ipotizzato che questo sia il meccanismo attraverso il quale può resistere a condizioni ambientali avverse per molti mesi e negli aerosol.

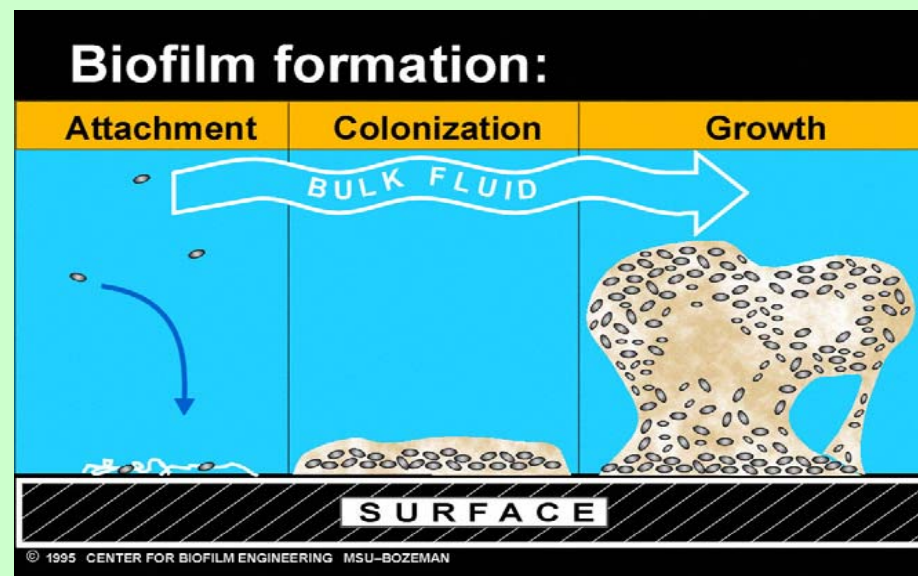
# Biofilm



È costituito da batteri, protozoi, alghe e funghi immersi in una matrice organica.

Aderisce alle pareti interne di tubature ed altre strutture con cui l'acqua entra in contatto.

Si calcola che il 99% dei batteri presenti nell'acqua sia insediato nel biofilm, dal quale passano nell'acqua con un continuo interscambio, regolato da meccanismi complessi.







## Fattori favorenti la formazione del biofilm:

- Presenza di sostanze nutrienti provenienti sia dall'acqua che dal materiale usato per la costruzione degli impianti
- Presenza di corrosioni ed incrostazioni nelle tubature
- Temperatura dell'acqua
- Ristagno o flussi lenti nei punti terminali delle tubature e in cisterne





**Legionella può trovarsi all'interno degli impianti idrici in:**

- **Forma libera (forma planctonica, poco riscontrata)**
- **Come componente del biofilm**

**Il biofilm è un fattore favorente la crescita di Legionella**

- **Permette al microrganismo di resistere a condizioni ambientali avverse (trattamento con cloro o altri biocidi)**
- **Fornisce sostanze nutrienti**
- **La presenza di protozoi permette a Legionella di moltiplicarsi e svolgere il proprio ciclo vitale al loro interno**



# Legionella: contaminazione ambientale

## Habitat naturale

Ubiquitaria nell'ambiente;  
serbatoio principale e' l'acqua  
E' stata isolata da:

- Fiumi
- Laghi
- Acque stagnanti
- Pozzi
- Sorgenti termali

Una specie è stata isolata  
dal suolo (*L. longbeachae*)





## Habitat artificiale

dall'ambiente naturale Legionella può passare nell'ambiente artificiale nel quale, in presenza di condizioni che ne favoriscono lo sviluppo, può raggiungere concentrazioni molte elevate:

poche cellule microbiche entrano negli impianti e si riproducono.



## Habitat artificiale

- Reti di distribuzione dell'acqua (di ospedali, alberghi, comunità, stabilimenti termali, piscine, spogliatoi di impianti sportivi)
- Impianti di condizionamento dell'aria (torri di raffreddamento, umidificatori, filtri, acqua di condensa)
- Piscine e vasche idromassaggio
- Fontane e fontanelle ornamentali
- Apparati in grado di produrre aerosol





## Condizioni che favoriscono lo sviluppo di Legionella nell'ambiente artificiale

- Temperatura dell'acqua compresa tra i 20 e i 45°C
- Biofilm e/o sostanze organiche
- Fenomeni di ristagno dell'acqua (rami morti o scarsa circolazione)
- Incrostazioni e depositi nelle tubature
- Scarsa manutenzione e poco ricircolo nei serbatoi di accumulo



arpav

**Il laboratorio ARPAV di Padova effettua la ricerca di Legionella su matrici ambientali dal 1999, operando come organo tecnico di supporto alle ALSS.**

**Con nota prot.n°50485/50.03.50 del 28 ottobre 2002 è stato individuato dalla Regione Veneto come Laboratorio di Riferimento Regionale con attività di diagnosi microbiologica di legionellosi in matrici ambientali.**



## Legionella: analisi microbiologica

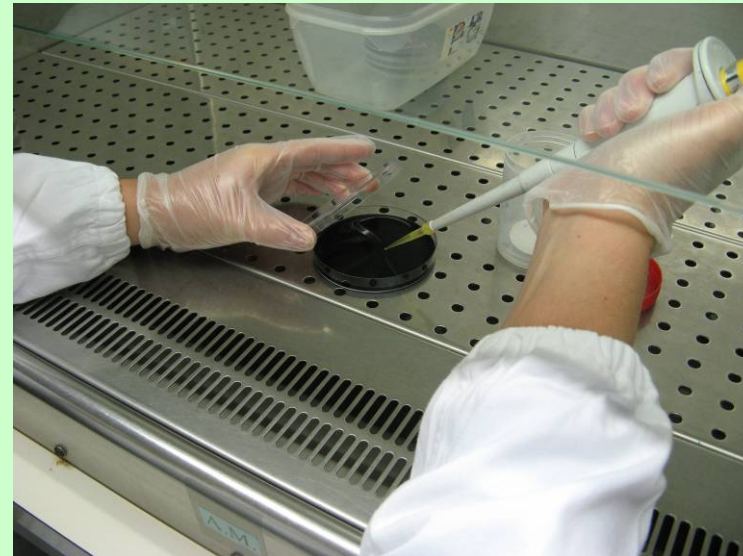
(metodo di riferimento: Doc 04/04/2000 in GU n. 103 del 05/05/2000 All 2,3)

- Filtrazione del campione (1litro) su membrana in nylon con porosità di  $0,2\mu\text{m}$ ;
- "Distacco" dei batteri adesi alla membrana
- Trattamento di decontaminazione del campione (30' a  $50^{\circ}\text{C}$ )
- Semina di 100  $\mu\text{l}$  di campione non trattato e trattato al calore su Legionella selective medium (GVPC)
- Incubazione a  $36^{\circ}\text{C}$  in aerobiosi, in ambiente umido, con il 2.5% di  $\text{CO}_2$  per max 10 giorni
- Prova differenziale preliminare (semina in Agar sangue e GVPC)
- Identificazione (tipizzazione sierologica e colorazione di Gram)



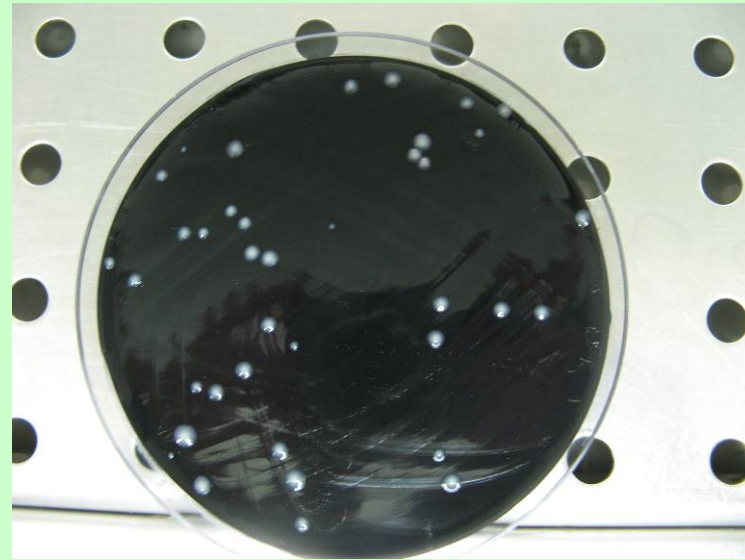
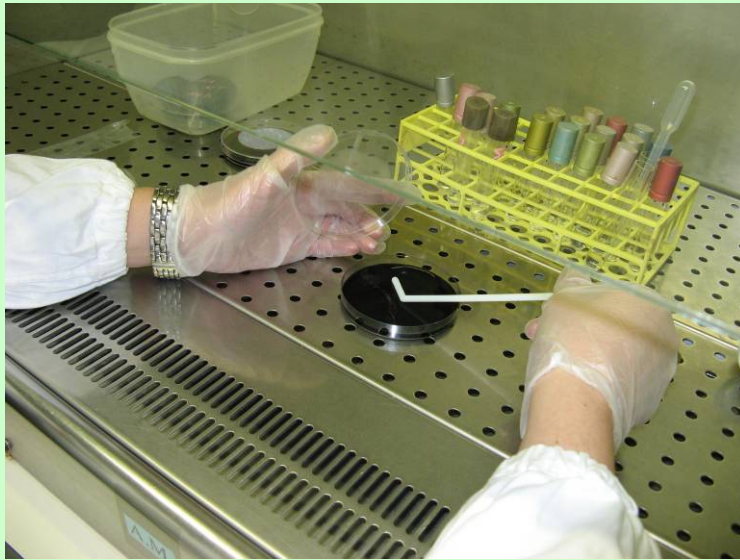


arpav





arpav





## ATTIVITA' ANNI 2003 - 2007

### Campioni analizzati :

totale = 2589

- 96% campioni acqua ( termale e sanitaria)
- 4% altre matrici (tamponi, filtri)

### Prelevati presso:

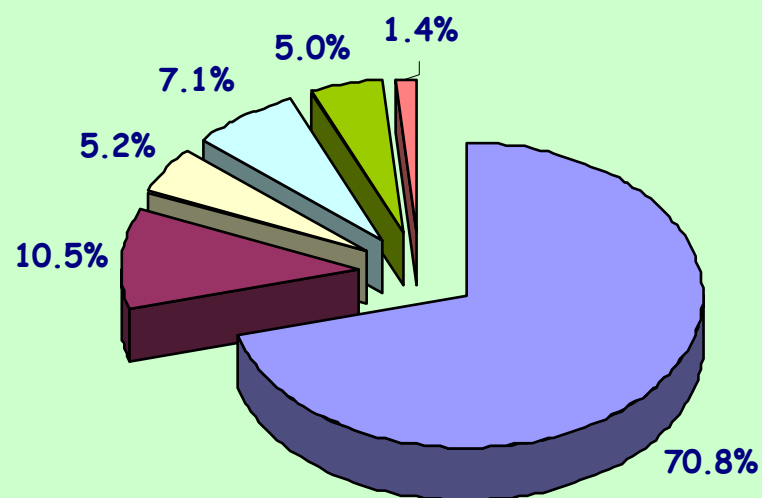
- Stabilimenti termali
- Strutture turistico-ricettive
- Ospedali e Case di Riposo
- Motonavi
- Abitazioni private
- Altre strutture (studi odontoiatrici, fabbriche, piscine)

### Punti di prelievo:

- Alimentazione aerosol ed inalatori, docce camerini fanghi (stabilimenti termali)
- docce o lavelli camere (stabilimenti termali ed altre strutture)



## CAMPIONI ANALIZZATI ANNI 2003-2007 (totale 2589)



■ STABILIMENTI TERMALI  
■ OSPEDALI E CASE DI RIPOSO  
■ ABITAZIONI PRIVATE

■ STRUTTURE TURISTICO RICETTIVE  
■ MOTONAVI  
■ ALTRE STRUTTURE

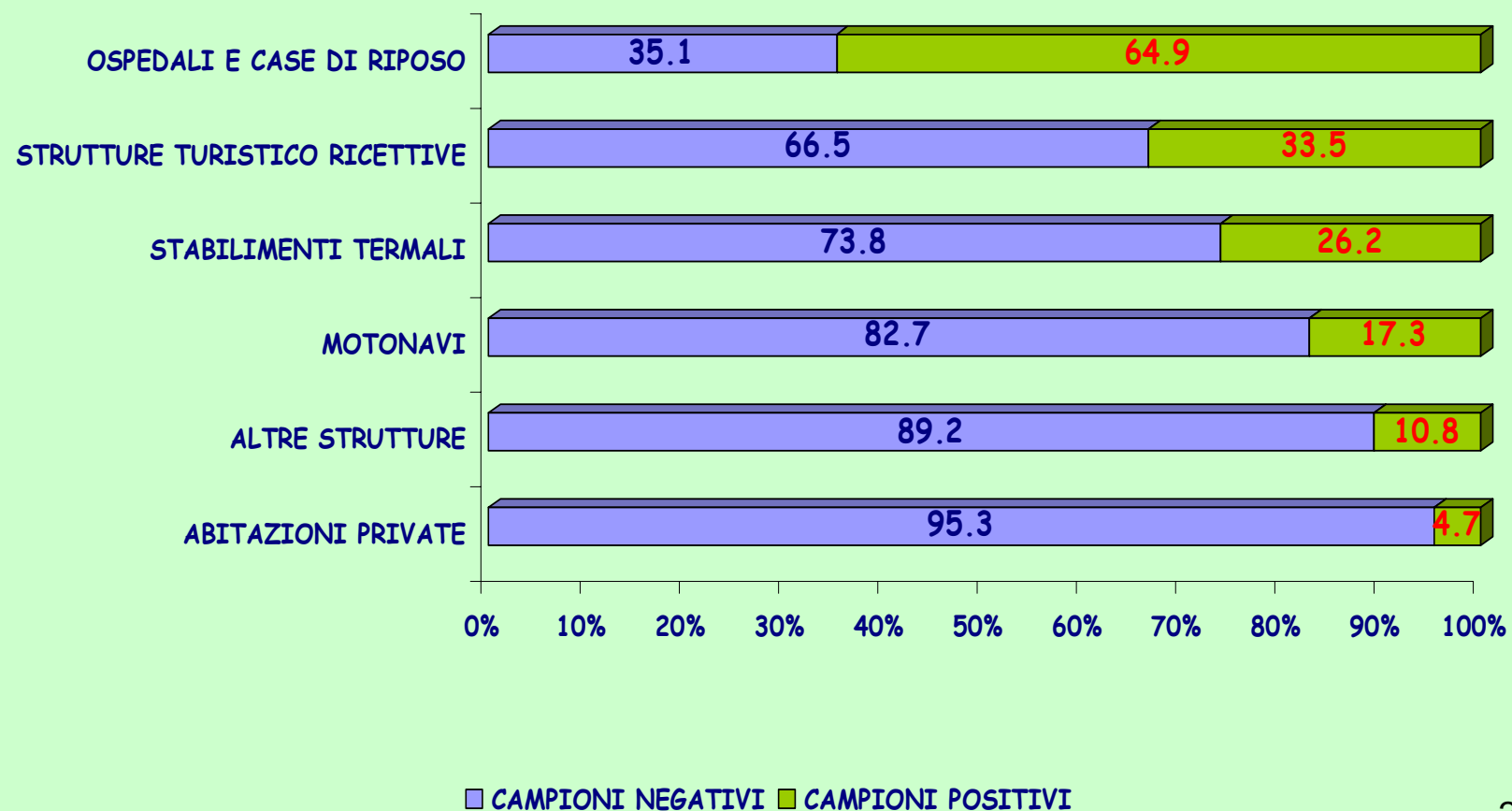


## Legionella è stata isolata complessivamente in 700 campioni (27.0%)

TIPO DI STRUTTURA	N. CAMPIONI ANALIZZATI	N°CAMPIONI POSITIVI	% CAMPIONI POSITIVI
STABILIMENTI TERMALI	1832	480	26.2
STRUTTURE TURISTICO RICETTIVE	272	91	33.5
MOTONAVI	185	32	17.3
OSPEDALI E CASE DI RIPOSO	134	87	64.9
ABITAZIONI PRIVATE	129	6	4.7
ALTRE STRUTTURE	37	4	10.8
<b>totale campioni</b>	<b>2589</b>	<b>700</b>	<b>27.0</b>



## CAMPIONI NEGATIVI/POSITIVI ANNI 2003-2007

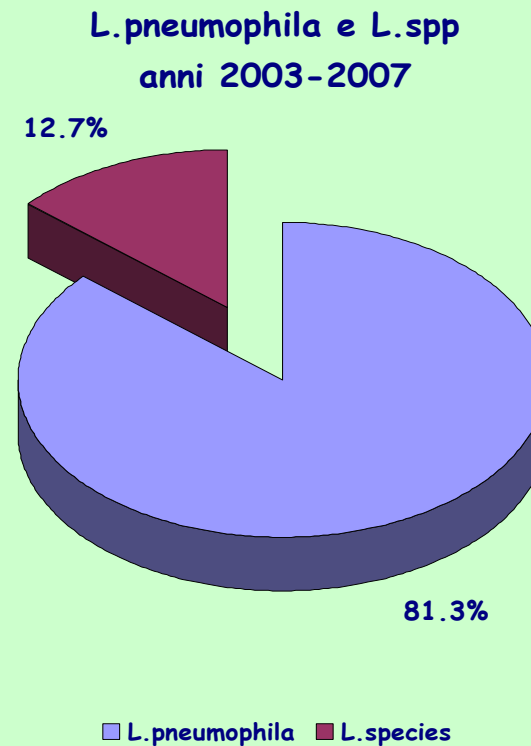




## Tipizzazione sierologica

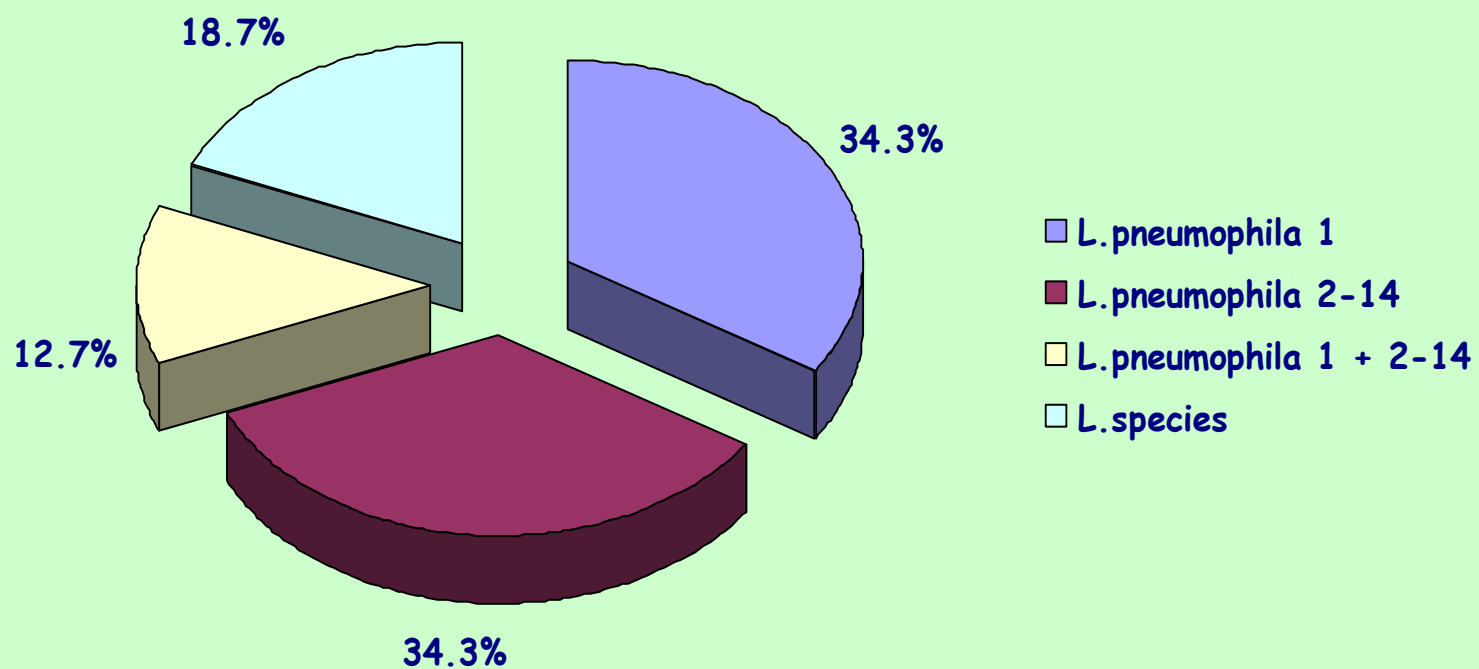
I ceppi di Legionella isolati sono stati sottoposti a tipizzazione sierologica

Complessivamente, indipendentemente dalla tipologia delle strutture, Legionella pneumophila è la specie maggiormente isolata (81.3%)





## LEGIONELLA SPP E SIEROGRUPPI ANNI 2003-2007 (totale campioni 700)







## Legionella spp e sierogruppi per struttura

TIPO DI STRUTTURA	L. pneumophila 1	L. pneumophila 2-14	L. pneumophila 1 + 2,14	L. species
STABILIMENTI TERMALI	32.7%	35.2%	13.1%	19.0%
STRUTTURE TURISTICO RICETTIVE	38.5%	36.3%	8.8%	16.4%
OSPEDALI E CASE DI RIPOSO	44.8%	26.4%	11.5%	17.3%
MOTONAVI	28.1%	28.1%	25.0%	18.8%
ABITAZIONI PRIVATE	0%	33.3%	0%	66.7%
ALTRE STRUTTURE	0%	100%	0%	0%



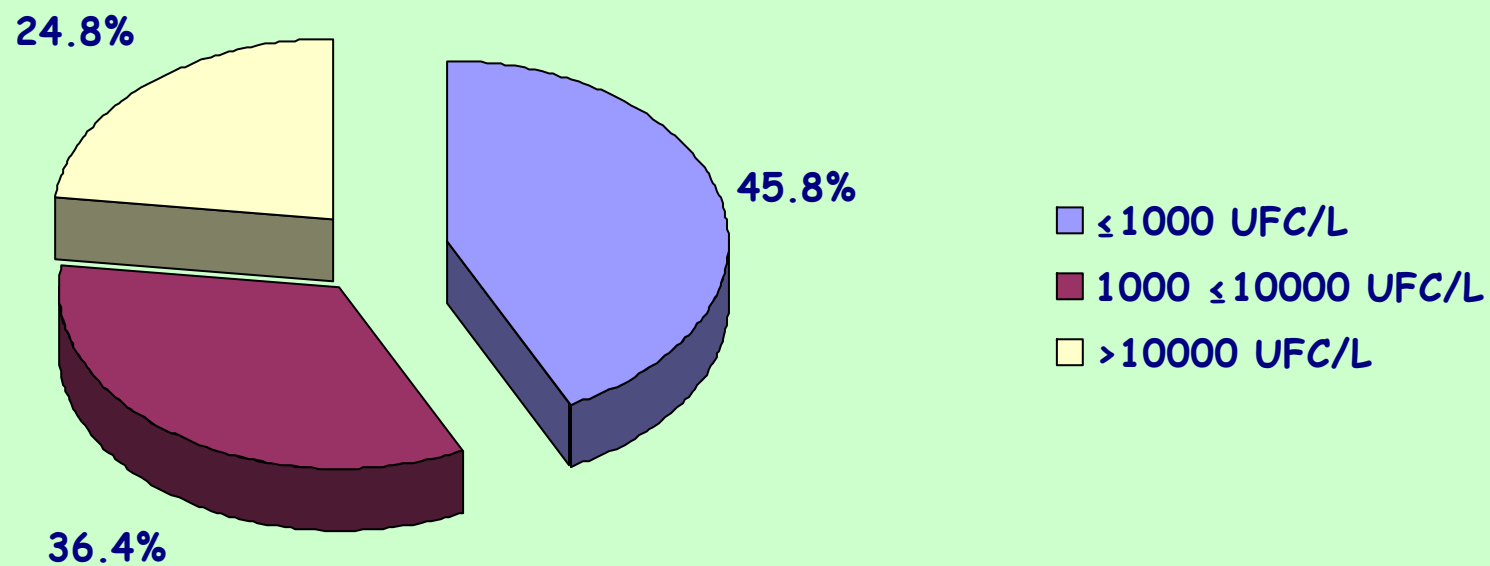
## LIVELLO DI CONTAMINAZIONE

In base alla concentrazione di Legionella riscontrata, i campioni positivi sono stati suddivisi in 3 categorie:

- Campioni con concentrazione di Legionella  $\leq 1000$  UFC/L
- Campioni con concentrazione di Legionella  $> 1000 \div \leq 10000$  UFC/L
- Campioni con concentrazione di Legionella  $> 10000$  UFC/L



## CAMPIONI IN BASE ALLA CONCENTRAZIONE DI LEGIONELLA





## Campioni per struttura in base alla concentrazione di Legionella

Tipo di struttura	≤1000 UFC/L	1000 ≤10000 UFC/L	>10000 UFC/L	totale (%)
STABILIMENTI TERMALI	45.6%	37.3%	17.1%	100
STRUTTURE TURISTICO RICETTIVE	47.3%	27.4%	25.3%	100
OSPEDALI E CASE DI RIPOSO	41.4%	39.1%	19.5%	100
MOTONAVI	53.1%	46.9%	0%	100
ABITAZIONI PRIVATE	66.7%	0%	33.3%	100
ALTRE STRUTTURE	50.0%	50%	0%	100



## Concludendo.....

- Campioni analizzati: 2589
- Campioni positivi: 700 (27.0%)
- Strutture dove si è rilevato il maggior numero di campioni positivi: Ospedali e Case di Riposo
- Campioni dai quali è stata isolata in maggior percentuale *Legionella pneumophila* sierogruppo 1: Ospedali e Case di Riposo

**tuttavia.....**

nella percentuale maggiore di campioni (45.8%)

la concentrazione di *Legionella*

è  $\leq 1000$  UFC/L



arpav

**GRAZIE PER L'ATTENZIONE!!!**

