

RICERCA DI LEGIONELLA IN CAMPIONI AMBIENTALI

Introduzione

Legionella spp è un batterio aerobio Gram negativo, responsabile di una **forma grave di polmonite** e deve il suo nome all'epidemia che nel 1976 colpì un gruppo di veterani dell'American Legion a Filadelfia. Microorganismo ubiquitario, è principalmente associato alla presenza di acqua: è stato isolato in ambienti idrici naturali (laghi e corsi d'acqua, sorgenti termali, falde idriche ed ambienti umidi in generale) dai quali può raggiungere quelli artificiali (impianti idrici, fontane, piscine, vasche idromassaggio, impianti di condizionamento), creando una potenziale situazione di rischio per la salute umana. L'infezione si trasmette attraverso l'inalazione degli aerosol contenenti il batterio, causando una malattia definita "legionellosi", che si può manifestare sia in forma di polmonite con un tasso di mortalità variabile tra 10-15%, sia in forma febbrile extrapolmonare o in forma asintomatica.

Responsabile della maggioranza dei casi è Legionella pneumophila e in particolare il sierogruppo 1.

Le condizioni che favoriscono lo sviluppo di Legionella sono:

- temperatura compresa tra 25 e 45°C
- situazioni di ristagno dell'acqua
- presenza di biofilm
- presenza di elementi in tracce (ferro in particolare).

Va tenuto presente che Legionella sopravvive anche in condizioni ambientali sfavorevoli, sotto forma di parassita di protozoi ciliati ed amebe.

Dal punto di vista microbiologico, Legionella è in grado di crescere in non meno di 2 giorni su terreno tamponato contenente estratto di lievito, carbone, L-cisteina e ferro, formando colonie spesso bianche, viola-blu o verdastre. La crescita in genere non si osserva in assenza di L-cisteina. Le colonie assumono un aspetto caratteristico a vetro smerigliato se osservate con stereomicroscopio a bassa intensità. Alcune colonie sviluppano fluorescenza se sottoposte a UV.

Trattandosi di un microrganismo di **classe di rischio 2** è necessario che i campioni siano prelevati da personale esperto, dotato di appropriati dispositivi di protezione individuali e operante in laboratori adeguatamente attrezzati con cappe Biohazard di classe II, mantenendo le condizioni di sterilità ambientale ed evitando le cross-contaminazioni con eventuali altri campioni.

Normative

ISO 11731:2017 Water quality - Enumeration of Legionella

Nel 2015 in Italia sono state approvate in Conferenza Stato-Regioni le "Linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi". Si tratta di un importante documento finalizzato a riunire, aggiornare e integrare in un unico testo tutte le indicazioni riportate nelle precedenti linee guida nazionali e normative.

ISO 3696 Water for analytical laboratory use — Specification and test methods

ISO 7704 Water quality — Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses

ISO 8199 Water quality — General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture

ISO 11133 Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media

ISO 19458 Water quality — Sampling for microbiological analysis

PROCEDURA DI ANALISI ISO 11731:2017

Le matrici interessate sono **tutti i tipi di campioni ambientali di acque, incluse acque potabili, industriali e naturali, e matrici associate (sedimenti, depositi e fanghi).**

La procedura si compone di queste fasi principali:

1. Prelievo, trasporto e conservazione del campione
2. Concentrazione e decontaminazione del campione
3. Semina su terreno selettivo
4. Esame delle piastre dopo incubazione
5. Test di conferma

1. PRELIEVO, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

I campioni vanno raccolti, conservati e trasportati secondo **ISO 19458**. Durante il trasporto e la conservazione di campioni di acqua per l'analisi microbiologica è necessario mantenere la rappresentatività del campione da analizzare e quindi prevenire il decadimento o la ricrescita dei microrganismi presenti. Per quanto possibile, si devono quindi limitare alterazioni che sono spesso inevitabili in un'aliquota ridotta di acqua mantenuta in un contenitore chiuso.

L'acqua da analizzare (almeno 1 litro) va campionata in bottiglie sterili di vetro o plastica, nella quali va aggiunto, in caso di acque clorate, potassio o sodio tiosolfato. Se il sistema di disinfezione utilizza ioni rame o argento, si neutralizza invece con EDTA.

Il campionamento di biofilm, incrostazioni, sedimenti va effettuato con tamponi, bisturi o provettine a seconda della consistenza.



Tutti i campioni, dall'atto del prelievo sino all'arrivo in laboratorio, vanno conservati ad una temperatura inferiore a 10°C; l'intervallo tra **2-8 °C** è quello consigliabile.

Fermo restando che il tempo che intercorre tra prelievo e analisi dei campioni, indipendentemente dalla loro natura, deve essere il più breve possibile, nel caso di acque destinate al consumo umano, corre l'obbligo di **non superare le 24 ore**.

2. CONCENTRAZIONE E DECONTAMINAZIONE DEL CAMPIONE

Solo i campioni che si presume contengano un'alta carica di legionelle ($> 10^4$ CFU/L) possono essere analizzati senza i passaggi di concentrazione. Nella maggior parte dei casi, invece, i campioni di acqua devono essere **concentrati mediante filtrazione su membrana**.



Concentrazione per filtrazione

La filtrazione può essere eseguita mediante filtrazione sotto vuoto o filtrazione a pressione positiva. La tecnica della filtrazione con membrana filtrante è riportata nella norma **ISO 8199**.

Piastratura diretta: si procede filtrando il campione (non trattato, trattato con acido e, se richiesto, trattato con calore) e posizionando direttamente la membrana sul terreno di coltura. Si usano membrane nitrato di cellulosa o esteri misti di cellulosa, diametro 47-50 mm, porosità 0,2 µm o 0,45 µm. Le membrane nere danno maggiore contrasto alle colonie bianche di Legionella.

Recupero delle legionelle dalla membrana: si procede filtrando il campione e trasferendo la membrana in un contenitore con soluzione sterile di Page (o Ringer, o PBS), che va poi agitato con un vortex o in un bagno a ultrasuoni per recuperare le legionelle.

Questo concentrato rappresenta il campione, e va diviso in tre porzioni: non trattato, trattato con calore e trattato con acido.

Si usano membrane di policarbonato o polietersulfone (PES), diametro 47-142 mm, porosità 0,2 µm.



Decontaminazione del campione

Per ridurre la crescita della flora interferente, che può ostacolare il recupero delle legionelle, i campioni di acqua sono sottoposti a trattamento con calore, trattamento acido o una combinazione di entrambi.

Calore: si posiziona il campione in un bagnetto termostatico a $50 \pm 1^\circ\text{C}$ per 30 ± 2 minuti.

Acido: si diluisce il campione con una soluzione acida e si lascia riposare per $5 \pm 0,5$ minuti.

Combinazione: prima si esegue il trattamento con calore e poi, una volta raffreddato, il trattamento con acido.

3. SEMINA SU TERRENO SELETTIVO

Le porzioni di campione trattate e non sono inoculate su piastre di terreno selettivo per Legionella e incubate. Per la conferma si sfrutta la capacità di Legionella di crescere solo in terreno con cisteina e ferro, quindi le colonie caratteristiche vanno seminate in parallelo in terreno BCYE e BCYE senza cisteina.

Campioni con alta concentrazione di Legionella e bassa concentrazione di flora interferente

Si piastra direttamente il campione tal quale quando si presume che la carica di Legionella sia superiore a 10^4 CFU/l. Si inoculano 0,1-0,5 ml di campione su una piastra di BCYE agar e una piastra di BCYE+AB agar.

Campioni con bassa concentrazione di Legionella e bassa concentrazione di flora interferente

Piastratura diretta dopo filtrazione: si filtra il campione e si trasferisce la membrana non trattata su una piastra di BCYE agar. Le membrane trattate con acido vanno trasferite su una o più piastre dei terreni selettivi BCYE+AB agar o GVPC agar o MWY agar.

Piastratura dopo filtrazione e lavaggio: si inoculano 0,1-0,5 ml di ogni porzione (non trattata, trattata con acido e trattata con calore) di concentrato ottenuto dalla filtrazione e successivo lavaggio, su una piastra di BCYE agar e su una o più piastre dei terreni selettivi BCYE+AB agar o GVPC agar o MWY agar.

Campioni con alta concentrazione di flora interferente

Si analizzano i campioni non concentrati, concentrati o diluiti 1:10. Ogni sub-campione va suddiviso in tre porzioni di cui una non trattata, una trattata con acido e una con calore. Si inoculano 0,1-0,5 ml di ogni porzione su una piastra di GVPC agar o MWY agar.

Campioni con concentrazione molto elevata di flora interferente

Si analizzano i campioni non concentrati e diluiti 1:10 e 1:100 dopo un pre-trattamento con combinazione di calore e acido. Si inoculano 0,1-0,5 ml di ogni porzione su una piastra di GVPC agar o MWY agar.

Le piastre vanno incubate a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per 7-10 giorni in aerobiosi e in ambiente umido, inserendo le piastre in un contenitore.

4. ESAME DELLE PIASTRE DOPO INCUBAZIONE

E' bene esaminare le piastre ogni 24 h nei primi 4-5 giorni di incubazione. Legionella cresce lentamente e può essere mascherata dalla crescita di altri microrganismi.

Le colonie, di aspetto piccolo e leggermente convesse, compaiono mediamente dopo un periodo da **3 a 10 giorni di incubazione**, perciò si può eliminare una piastra come negativa solo dopo almeno 10 giorni.

Qualora nel campione ci fosse una elevata presenza di legionelle o di flora contaminante, sarà necessario eseguire sul campione concentrato alcune diluizioni in base 10 (con soluzione Ringer o soluzione Page) e se necessario di nuovo i trattamenti di decontaminazione, inoculando le diluizioni non trattate e trattate su terreno selettivo.

Le **colorazioni assunte dalle colonie delle varie specie possono essere molto diverse**: generalmente bianche o grigie, ma anche blu, porpora, marroni, rosa, verdognole o rosso scuro. Osservate allo stereomicroscopio con luce incidente a bassa intensità, tutte però mostrano il caratteristico aspetto a vetro smerigliato.

Rispetto alla crescita diretta su agar, la crescita su membrana ha alcune caratteristiche peculiari:

- Legionella cresce più lentamente;
- le colonie che si formano sono più piccole;
- alcune specie possono non crescere affatto

Molte specie, osservate con microscopio a UV (ad una lunghezza d'onda di 360 ± 2 nm), emettono fluorescenza con colori caratteristici per ogni specie. Per evitare l'uccisione delle colonie è bene sottoporre le piastre agli UV per il minimo tempo necessario.



5. TEST DI CONFERMA

Per la conferma si sfrutta la capacità di Legionella di **crescere solo in terreno con cisteina**, quindi le colonie caratteristiche vanno seminate in parallelo in terreno BCYE e **BCYE-Cys (o Blood agar, Nutrient agar, TSA)**.

Per ogni piastra di terreno selettivo, si seleziona casualmente un certo numero di colonie caratteristiche o sospette, per effettuare una subcoltura di ognuna in BCYE agar e in BCYE-Cys agar. L'incubazione va poi effettuata a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per 2-5 giorni, **confermando come Legionella le colonie che crescono solo in BCYE agar**. Fanno eccezione Legionella oakridgensis e Legionella spiritensis, che richiedono L-cisteina e ferro per l'isolamento primario ma possono crescere debolmente anche in assenza di cisteina.

Inoltre, possono essere usati vari metodi di conferma addizionali, come il **test di agglutinazione al lattice**, che è in grado di rilevare specificamente Legionella pneumophila (sierogruppo 1 e 2-15) e le altre specie di Legionella più comuni.



Focus: CONTROLLO QUALITA' DEI TERRENI

Per la **verifica di fertilità, selettività e specificità** la norma a cui fare riferimento è la **ISO 11133**. E' possibile utilizzare un ceppo di riferimento oppure colture stock di Legionella.

BCYE agar

Produttività - Legionella pneumophila WDCM 00107

GVPC agar, BCYE+AB agar, MWY agar

Produttività - Legionella pneumophila WDCM 00107 (e/o 00180)

Legionella anisa WDCM 00106

Selettività - Enterococcus faecalis WDCM 00009 o 00087

Escherichia coli WDCM 00012 o 00013

BCYE-Cys agar, Blood agar, Nutrient agar, TSA

Conferma - Legionella pneumophila WDCM 00107 (e/o 00180)

TERRENI DI COLTURA E REAGENTI - [clicca link interattivo](#)

NOME PRODOTTO	CODICE	FORMATO
Legionella CYE Agar Base	C1311	500 g
Legionella BCYE Growth Supplement	C6022	Fiale
Legionella GVPC Supplement	C6025	Fiale
Legionella MWY Supplement	C6067	Fiale
Legionella BCYE Agar	20500	Piastre 90 mm
Legionella BCYE Agar	20613	Piastre 60 mm
Legionella BCYE+AB Agar	21868	Piastre 90 mm
Legionella GVPC Agar	1077	Piastre 90 mm
Legionella GVPC Agar	2277	Piastre 60 mm
Legionella BCYE w/o Cys Agar	20281	Piastre 90 mm
Legionella BCYE w/o Cys Agar	20611	Piastre 60 mm
Blood Agar	21877	Piastre 90 mm
Nutrient Agar	21876	Piastre 90 mm
TSA	1025	Piastre 90 mm
Acid Buffer (Tampone acido)	21869	Flaconi 100 ml
Ringer Solution 1:4	20174	Flaconi 100 ml
Page Saline Solution	20612	Flaconi 100 ml

CEPPI MICROBICI - [clicca link interattivo](#)

NOME PRODOTTO	CODICE	FORMATO
MicroSwabs Legionella pneumophila ATCC® 33152 *	MS-L006	pellet liofilizzati
LYOT-Bacteria Legionella pneumophila subsp. pneumophila ATCC 33152 - WDCM 00107 liofilizzato 10^2 UFC	LT-LP01-B	flaconcini
MicroSwabs Legionella anisa ATCC® 35292 - WDCM 00106	MS-L028	pellet liofilizzati
MicroSwabs Enterococcus faecalis ATCC® 19433 - WDCM 00009 *	MS-E014	pellet liofilizzati
MicroSwabs Enterococcus faecalis ATCC® 29212 - WDCM 00087	MS-E015	pellet liofilizzati
MicroPellet RT Enterococcus faecalis ATCC® 29212 - WDCM 00087, 2 pellet (20 dosi 10-100 CFU/dose) *	MP-RT-E015	pellet liofilizzati
MicroSwabs Escherichia coli ATCC® 8739 - WDCM 00012, 2 swab	MS-E032	pellet liofilizzati
MicroPellet RT Escherichia coli ATCC® 8739 - WDCM 00012, 2 pellet (20 dosi 10-100 CFU/dose) *	MP-RT-E032	pellet liofilizzati
MicroSwabs Escherichia coli ATCC® 25922 - WDCM 00013 *	MS-E025	pellet liofilizzati
LYOT-Bacteria Escherichia coli ATCC 25922 - WDCM 00013 liofilizzato 10^2 UFC	LT-EC03-B	flaconcini

CEPPOTECA - [clicca link interattivo](#)

NOME PRODOTTO	CODICE	FORMATO
Sistema Protect per conservazione microrganismi	TS80-MX, TS71-MX...	Perline ceramiche in brodo criopreservante

TEST DI CONFERMA

NOME PRODOTTO	CODICE
Legionella test al lattice	DR0800M *

MEMBRANE FILTRANTI - [clicca link interattivo](#)

NOME PRODOTTO	CODICE
Membrane MCE bianche reticolate sterili, 0,22 µm, ø 47 mm	MFMCE047022GWS
Membrane MCE bianche reticolate sterili, 0,45 µm, ø 47 mm	MFMCE047045GWS
Membrane MCE nere reticolate sterili, 0,22 µm, ø 47 mm	M47MCE022GBS
Membrane MCE nere reticolate sterili, 0,45 µm, ø 47 mm	M47MCE045GBS
Membrane PES bianche sterili, pori 0,22 µm, ø 47 mm	MFPE047022S
Membrane PES bianche sterili, pori 0,45 µm, ø 47 mm	MFPE047045S

SISTEMI FILTRANTI - [clicca link interattivo](#)

Serie WaterVac. Sistemi filtranti compatti a uno o due posti dotati di imbuti di acciaio o plastica, compatibili con imbuti monouso.

Serie MultiVac. Sistemi filtranti multipli, dotati di imbuti di acciaio o plastica, compatibili con imbuti monouso.



IMBUTI FILTRANTI - [clicca link interattivo](#)

La gamma comprende imbuti filtranti riutilizzabili, in acciaio o plastica autoclavabile (da 100 a 500 ml), e imbuti monouso con o senza membrana filtrante (da 100 a 300 ml).

BIBLIOGRAFIA

ISO 11731:2017 Water quality - Enumeration of Legionella

Linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi” Linee Guida approvate in Conferenza Stato-Regioni nella seduta del 7 maggio 2015 – Italia

ISO 19458:2006 Water quality - Sampling for microbiological analysis

ISO 11133:2014 Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media

* The ATCC Licensed Derivative® emblem, the ATCC Licensed Derivative® word mark and the ATCC® catalog marks are trademarks of ATCC® used under license. Kairosafe is licensed to use these trademarks and to sell licensed products manufactured for Mecconti using ATCC® materials derived from ATCC® cultures. Look for the ATCC Licensed Derivative® emblem for products derived from ATCC® cultures.

