

# impiego del perossido di idrogeno come metodo innovativo nel controllo di legionella nelle strutture sanitarie\*

di Aquino F.<sup>(1)</sup>; Totaro M.<sup>(1)</sup>; Galli I.<sup>(2)</sup>;  
Manfredini L.<sup>(2)</sup>; Guarneri F.<sup>(1)</sup>;  
Bianchi M. G.<sup>(1)</sup>; Tuvo B.<sup>(1)</sup>; Serini V.<sup>(2)</sup>;  
Valentini P.<sup>(1)</sup>; Casini B.<sup>(1)</sup>; Baggiani A.<sup>(1)</sup>

## Introduzione

Legionella spp. è un batterio Gram-negativo, aerobio, intracellulare, termofilo (optimum di crescita tra i 25 e i 42°C), responsabile di infezioni opportunistiche nell'uomo fra le quali l'entità nosologica principale è rappresentata da una grave polmonite, la malattia del legionario (LD; *Fields et al., 2002*). Questo patogeno trova il suo habitat naturale nell'acqua e in particolare nelle condutture idriche degli edifici, non fanno eccezione le strutture sanitarie dove Legionella è frequentemente associata a infezioni nosocomiali, in particolare tra i pazienti immunodepressi (trapiantati, affetti da AIDS, sottoposti a chemioterapia aggressiva) (*Muldrow LL et al., 1982; Dominguez et al., 2009*). Dei 1.497 casi notificati nel 2014 in Italia solo 62 (4,1%) erano riferibili a infezioni nosocomiali, ma è tra queste che si registra la letalità più alta: 30,8% rispetto al 10,1% delle infezioni comunitarie. La specie di Legionella implicata era in tutti i casi *Legionella pneumophila* (ISS 2015). Il controllo della colonizzazione da Legionella nelle reti dell'acqua calda delle strutture ospedaliere è quindi un obiettivo importante per la sicurezza dei pazienti, ma, al tempo stesso, risulta essere una problematica di difficile soluzione per l'ubiquitarità del batterio in ambien-



te acquatico e la sua resistenza intrinseca ai metodi di disinfezione. Il primo problema è rappresentato dalle caratteristiche degli impianti idrici che, in grandi edifici, quali gli ospedali, sono molto estesi e complessi e presentano spesso punti di ridotto flusso dell'acqua, come nei rami morti, dove meglio si sviluppa il biofilm al cui interno facilmente può proliferare Legionella. Questi impianti, soprattutto se un po' vetusti, presentano anche considerevoli livelli di corrosione delle tubature, condizione che costituisce un substrato favorevole alla crescita batterica e controindica taluni interventi di disinfezione per il rischio di guasti e rotture. Inoltre, anche le temperature a cui normalmente operano i sistemi di acqua calda non solo risultano lontane dai valori indicati ottimali per evitare la proliferazione del microrganismo ma, attestandosi spesso intorno ai 40-50°C, forniscono le condizioni ideali per la crescita di Legionella (*Brenner, Fealey e Weaver, 1984; Brenner, 1986; Fallon, 1990; States et al., 1993*). Legionella inoltre è un microrganismo molto resistente e adattabile, in grado di sopravvivere

ad una vasta gamma di condizioni naturali ed artificiali (*Fliermans, 1996*), anche sotto forma di cellula quiescenza, che può recuperare attività e virulenza al ripristino delle condizioni ambientale favorevoli. La prima revisione globale delle metodologie di disinfezione applicate all'acqua calda sanitaria è stata pubblicata nel 1990 (*Muraca et al., 1990*), un'altra, più recentemente nel 2011 (*Lin et al., 2011*); nessuna raccomandazione "evidence-based" può essere ancora fatta per i trattamenti potenzialmente applicabili per le reti idriche ospedaliere. Il CDC (Center of Disease Control) di Atlanta (USA) raccomanda nelle sue linee guida per la prevenzione delle polmoniti associate all'assistenza di verificare l'efficacia delle procedure di decontaminazione (*Tablan et al., 2004*) (*Casini et al. 2012; Cristina ML 2014*). Le linee guida per la prevenzione delle polmoniti associate all'assistenza dei Centers for Disease Control and Prevention (CDC) di Atlanta raccomandano di verificare l'efficacia delle procedure di decontaminazione dell'acqua (*Tablan et al., 2004*) (*Casini et al. 2012; Cristina ML 2014*). Diversi prodotti chimici, prevalentemente a base di cloro, sono stati impiegati nella disinfezione dell'acqua: tutti utili per il controllo e la riduzione della carica di Legionella, ma nessuno in grado di eliminarla completamente. Un particolare meccanismo di difesa contro i disinfettanti è il parassitismo intracellulare all'interno di protozoi, in particolare le ame-

be (Kilvington e al., 1990; Barker et al., 1992; Barker et al., 1995; Nwachuku e Gerba, 2004; Storey et al., 2004.). Per tale motivo, è evidenza condivisa da numerosi studi, la completa eradicazione di Legionella dalle reti idriche delle strutture sanitarie sembra praticamente impossibile da raggiungere (Rangel-Frausto et al., 1999; Stout e Yu, 2003; Scaturro et al., 2007). Questo porta a testare prodotti innovativi di disinfezione al fine di ottenere migliori risultati in termini di costo-efficacia. Attualmente torna ad essere utilizzato il perossido di idrogeno che, oltre al sempre più ampio impiego nella disinfezione delle superfici ospedaliere, sta trovando applicazione anche come disinfettante per l'acqua sanitaria. In questo campo può rappresentare un'alternativa ai prodotti a base di cloro e, in Francia, il Ministère de la Santé Publique lo considera, nella formulazione in combinazione con sali di argento, nelle linee guida per il trattamento di Legionella pneumophila (2002, Ministère des Affaires sociales et de la Santé). Il perossido di idrogeno è un forte ossidante, battericida in soluzione al 3% (valore D E.coli: 0,57 min), sterilizzante al 6% in 6 ore, più potente del biossido di cloro e più stabile alle alte temperature e alle variazioni del ph rispetto ai disinfettanti a base di cloro (Block, 2001). Inoltre non è tossico per l'organismo umano ed è esente da rischi di mutagenicità e cancerogenicità (FDA 1979 IARC 1987). Un'altra caratteristica interessante del perossido di idrogeno è che presenta numerosi vantaggi dal punto di vista economico: i costi operativi sono molto inferiori rispetto ai sistemi tradizionali, così come i costi di investimento e le spese per attrezzature. Inoltre il perossido è caratterizzato da un bassissimo effetto corrosivo, mentre la corrosione delle condutture è un problema frequente e assolutamente non trascurabile per sistemi di disinfezione a base di clo-

ro. Lo studio che è stato intrapreso è uno dei pochi finora effettuati sull'applicazione di questo tipo di disinfezione alla rete idrica di strutture sanitarie. Un'esperienza rilevante riguarda l'impiego di perossido di idrogeno combinato con ioni argento ed applicato nella rete idrica di un reparto da 50 posti letto di un grande ospedale israeliano. Nell'arco di un periodo di 24 mesi di trattamento è stato evidenziato un sorprendente abbattimento della contaminazione da Legionella, da valori di 200-14.000 CFU/L alla negativizzazione della quasi totalità dei campioni colturali (Shuval H et al. 2009). Altre due sperimentazioni, eseguite in due strutture per lungodegenti in Italia, sono state basate sulla medesima formulazione del disinfettante; in questi casi non vi è stato un abbattimento totale della colonizzazione, tuttavia la conta media di Legionella è stata ridotta di circa 2 log. (Ricci ML et al. 2006; Cristino S. et al. 2011). Un recentissimo studio dell'Università di Modena e Reggio Emilia ha valutato l'impiego di un trattamento basato sul solo perossido di idrogeno in un edificio altamente contaminato da Legionella. I risultati hanno dimostrato una rapida riduzione iniziale della concentrazione di Legionella, la quale si è successivamente mantenuta costantemente a concentrazioni inferiori durante i primi mesi di trattamento, fino a evidenziare una sua completa scomparsa in oltre il 90% dei campioni dopo l'ottavo mese. Altra evidenza interessante che è emersa è stata la progressiva selezione di alcune specie di Legionelle come *L. jamestowniensis*, ad alcuni sierogruppi appartenenti a *Legionella pneumophila*. (Marchesi I et al. 2016.). Scopo della nostra ricerca è valutare, per un periodo di 36 mesi, il livello di contaminazione da *Legionella* spp. nella rete idrica di un Presidio Ospedaliero sottoposto a disinfezione in continuo dell'acqua calda sanitaria con perossido di idrogeno.

## Materiali e metodi

### Setting d'indagine

Il Presidio Ospedaliero Villamarina di Piombino è un piccolo ospedale (136 posti letto, 120 ordinari e 16 DH) che fa parte della rete ospedaliera dell'Asl Toscana Nordovest ed insiste su un bacino di utenza di circa 60.000 abitanti. Costruito agli inizi degli anni '90 come ampliamento di una preesistente struttura è attivo dal 1992. La struttura architettonica dell'ospedale è quella di un monoblocco a prevalente sviluppo verticale con una piastra centrale su 3 piani (-2,-1, piano terra) e tre blocchi verticali, adibiti prevalentemente a degenze, di cui uno su cinque piani e gli altri due su quattro. Le Specialità di riferimento sono le seguenti: Cardiologia, UTIC, Terapia Intensiva, Medicina Generale, Oncologia, Chirurgia generale, Urologia, Ortopedia, Otorino, Oculistica, Ostetricia e Ginecologia, Pediatria. Nel luglio 2013, nell'ambito dell'implementazione di un water safety plan (WSP) per il P.O., inizia un programma di monitoraggio sistematico attraverso il campionamento dell'acqua presso i punti finali di utilizzo e viene prevista la disinfezione dell'acqua calda sanitaria.

### Disinfezione dell'acqua

Nella scelta del disinfettante da impiegare, tenuto conto dello stato (piuttosto datato e deteriorato) e dei materiali costitutivi (tubature in acciaio zincato) dell'impianto idrico, si è scartato il biossido di cloro, per i noti rischi di corrosione e i connessi costi di manutenzione, optando per un prodotto innovativo quale il perossido di idrogeno. La prima azione messa in atto è stata una disinfezione shock dell'impianto con una soluzione di perossido di idrogeno e ioni argento per 12h. A questa è seguita una disinfezione in continuo basata sull'applicazione, tramite un apposito dosatore, di livelli più bassi della stessa formulazione disinfettante: 10 mg/L

perossido di idrogeno e 10mg ioni argento. Successivamente, nel settembre 2013, la combinazione perossido di idrogeno – ioni argento è stata sostituita con perossido di idrogeno a 25 mg/L, il cui impiego isolato rappresenta un elemento innovativo di questo studio. In aggiunta al disinfettante è stato previsto l'utilizzo di un prodotto filmante, i polifosfati, per ridurre i livelli di corrosione dell'impianto. Questa formulazione è stata poi utilizzata senza ulteriori cambiamenti per tutto il restante periodo dello studio, da settembre 2013 a giugno 2016, con l'unica eccezione del luglio 2014, quando, probabilmente a causa di un malfunzionamento del dosatore, la concentrazione di perossido di idrogeno era scesa a 10 mg/L.

#### Campionamento e ricerca di Legionella

Tra luglio 2013 e giugno 2016 presso il P.O. di Piombino sono stati raccolti per l'esecuzione degli esami colturali 55 campioni di acqua calda. Sono stati selezionati per il campionamento quattro punti acqua, distribuiti su diversi piani dell'ospedale, affinché fossero rappresentativi dell'intero sistema idrico: un bagno del Pronto Soccorso (piano seminterato), una stanza del reparto di terapia intensiva (piano terra), una degenza del Day-Hospital di Oncologia (primo piano) e un lavaggio mani della sala parto dell'Ostetricia e Ginecologia (quarto piano). Dal luglio 2014 è stato aggiunto un quinto punto di campionamento presso il circuito di ricircolo della rete dell'acqua calda. Sui campioni di acqua è stata effettuata la ricerca colturale di Legionella, inoltre sono stati analizzati i seguenti parametri fisico-chimici: Temperatura (° C), pH (unità pH), conduttività (mS/cm), torbidità (NTU), ioni ferro (mg/L Fe). Parallelamente la concentrazione di disinfettante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mg/L) in acqua è stata regolarmente misurata al punto di utilizzo per avere un controllo preciso dei livelli di Perossido di Idrogeno nella rete idrica. La

concentrazione di perossido è stata determinata eseguendo il test colorimetrico con strisce reattive Merckoquant®. Durante il primo campionamento, per determinare i livelli basali di colonizzazione dell'impianto sono stati raccolti per ogni punto di prelievo due campioni d'acqua: uno istantaneo e uno dopo flussaggio di 5 minuti. Nei campionamenti successivi, tuttavia, sono stati raccolti solo campioni flussati, in quanto più indicativi dei livelli di contaminazione complessiva della rete idrica. La ricerca di *Legionella* spp. in campioni d'acqua calda è stata eseguita considerando il protocollo indicato nelle linee guida italiane (Linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi, 2015) e la norma ISO 11731. Pertanto un litro di acqua è stato concentrato mediante la tecnica della filtrazione attraverso una membrana avente una porosità 0,2 µm di diametro (Millipore, Billerica, MA). Dopo la filtrazione la membrana è stata immersa in 10 ml dell'acqua campionata in modo da essere sottoposta ad un trattamento di sonicazione per 5 minuti che consente, tramite l'impiego di ultrasuoni, il distacco delle cellule dalla membrana e il loro passaggio nei 10 ml di acqua in cui è sospesa la membrana stessa. Tale sospensione è stata poi sottoposta ad un tratta-

to di termoinattivazione a 50°C per 30 minuti con lo scopo di selezionare *Legionella* spp. inattivando tutte le specie microbiche non resistenti a tale temperatura. Dopo la fase di inattivazione termica 0,1 ml della sospensione è stato seminato su terreno di coltura BCYE Agar. Le piastre seminate sono state incubate a 37°C per 7-10 giorni all'interno di giare nelle quali è stata creata un'atmosfera modificata mediante un ambiente umido con un tenore di CO<sub>2</sub> del 2,5%. Le colonie tipiche di Legionella cresciute su BCYE sono state sottoposte ad analisi di identificazione di specie e sierogruppo attraverso un test di agglutinazione polivalente su lattice (*Legionella latex test*, Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK).

#### Risultati

Nel campionamento eseguito prima dell'inizio del trattamento dell'acqua con perossido di idrogeno erano state rilevate elevate cariche di Legionella in tutti i punti di prelievo. Le concentrazioni variavano da 3.000 a 20.800 UFC/L, con un valore medio di 10000 UFC/L nei campioni d'acqua flussati, a dimostrazione di una notevole contaminazione di tutta la rete idraulica dell'edificio ospedaliero (campionamento del 3 Luglio 2013). La specie batterica inizialmente rilevata era Legionella pneu-

51  
GSA  
APRILE  
2017

Fig. 1: Concentrazione (UFC/L) di *Legionella pneumophila* 2-15 rilevata presso il P.O. di Piombino prima dell'inizio della disinfezione con Perossido di Idrogeno (campionamento del 03/07/2013), sono riportati per raffronto i livelli di carica batterica dei campioni istantanei e flussati.

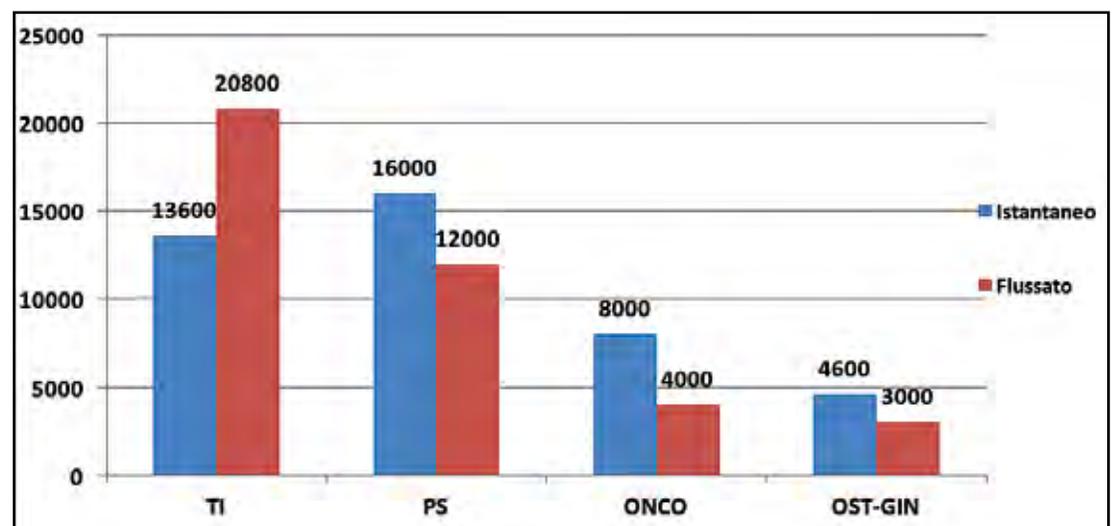
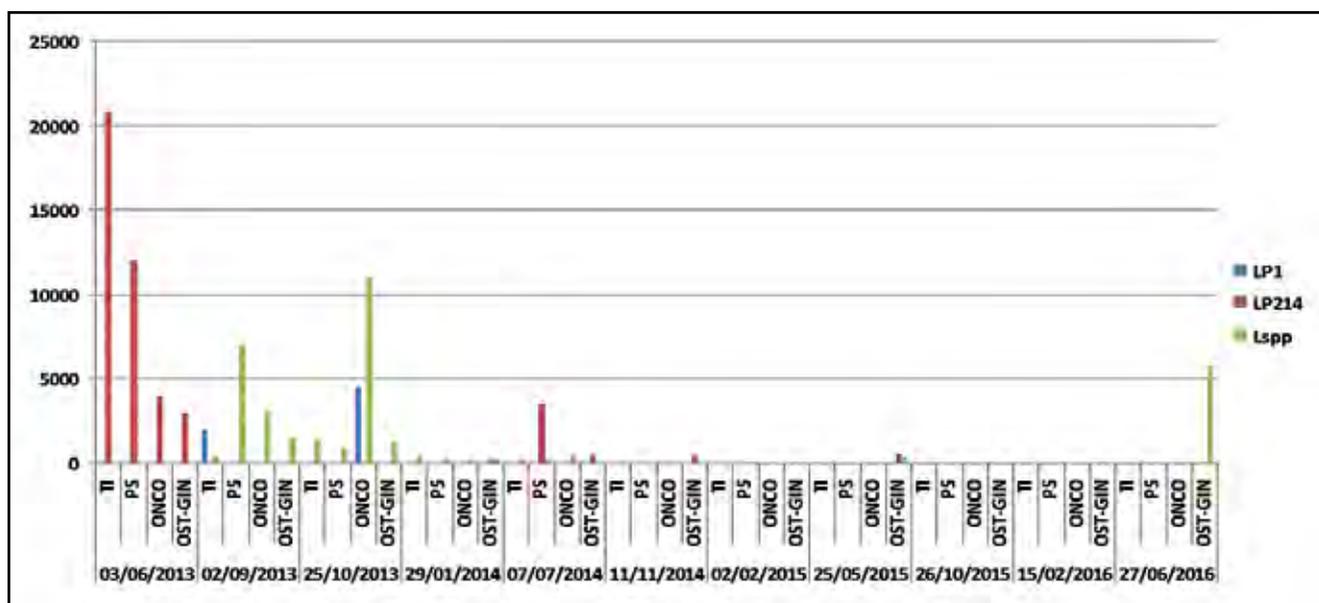


Fig. 2: Concentrazione (UFC/L) delle varie specie di Legionella (*L. pneumophila* 1, *L. pneumophila* 2-15, *L. spp*) rilevate nei 4 punti di campionamento siti in reparti ospedalieri (Terapia Intensiva, Pronto Soccorso, Oncologia, Ostetricia e Ginecologia) durante tutto il periodo di monitoraggio, Luglio 2013 – Giugno 2016.

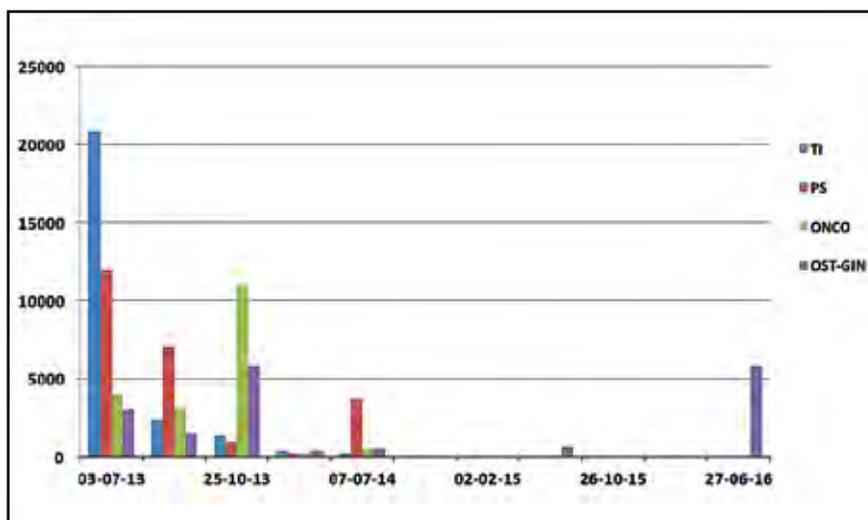


mophila 2-15 (Fig. 1). Dopo l'attuazione della disinfezione shock con un dosaggio 10X di una soluzione di perossido di idrogeno (10 mg / L) e ioni argento (10 mg / L) per 12h e l'introduzione del dosatore in continuo di tale soluzione disinfettante la positività per Legionella pneumophila 2-15 si riduceva ad un solo sito. Tuttavia dopo questi primi trattamenti venivano isolate nuove specie di Legionella, non precedentemente riscontrate; si trattava principalmente di Legionella spp., ma alcuni campioni risultavano positivi anche per Legionella pneumophila 1. Questi risultati, considerati non soddisfacenti, portavano al cambiamento del disinfettante nel

settembre 2013: la formulazione con ioni argento è sostituita dal solo perossido a concentrazione più elevata, 25 mg/L, con l'aggiunta dei polifosfati come prodotto filmante. Questa strategia di disinfezione otteneva risultati tangibili dopo i primi sei mesi dal suo avvio. Un campionamento effettuato in ottobre 2013 mostrava una situazione simile a quella di luglio, tuttavia dal gennaio 2014 le analisi microbiologiche evidenziano una progressiva riduzione della carica di Legionella, con la scomparsa di *L.p* 1 e concentrazioni delle altre specie inferiori a 500 CFU/L. Nel luglio 2014 si osserva come una riduzione dei livelli di perossido di idrogeno da 25 a

10 mg/L, probabilmente legata ad un malfunzionamento del dosatore, abbia causato un incremento delle concentrazioni di Legionella, tanto che in un sito del campionamento si registra la ricomparsa di oltre 3000 CFU/L di Legionella 2-15. Tuttavia i valori medi della carica batterica si mantengono significativamente più bassi rispetto alla situazione iniziale. Riportando la concentrazione di perossido di idrogeno a 25 mg / L, e mantenendola stabile nel tempo, l'efficacia del trattamento risulta evidente. Nel successivo controllo (novembre 2014) tutti i campioni raccolti risultano negativi, ad eccezione del sito posto al quarto piano (Ostetricia e Ginecologia). I successivi controlli (febbraio 2015, maggio 2015, ottobre 2015, febbraio 2016, giugno 2016) dimostrano in tutti i siti assenza di contaminazione da Legionella, con l'esclusione di due positività rilevate a maggio 2015 (600 UFC/L di *L.p.* 2-15) e giugno 2016 (400 e 5800 UFC/L di *L.spp.*) nuovamente nel lavaggio mani del quarto piano (Fig. 2, Fig. 3). I maggiori livelli di contaminazione di questo punto potrebbero essere dovuti alla sua posizione, che è la più distale sulla rete idrica rispetto al dosatore di perossido, e allo scarso utilizzo del lavaggio mani in questione che porta quindi ad un maggiore ristagno

Fig. 3: Concentrazione (UFC/L) di Legionella per punto di campionamento nei 4 reparti ospedalieri oggetto del monitoraggio (Terapia Intensiva, Pronto Soccorso, Oncologia, Ostetricia e Ginecologia) fra Luglio 2013 e Giugno 2016.



dell'acqua nel tratto terminale. Inoltre l'applicazione della nuova formulazione disinfettante associata al prodotto filmante avrebbe avuto un effetto positivo anche nel contenimento dei fenomeni corrosivi, a giudicare dai risultati del monitoraggio del ferro disciolto in acqua, assunto quale indicatore indiretto di questi stessi fenomeni, e dalla diminuzione degli interventi di manutenzione sull'impianto.

### Conclusioni

I risultati di questa sperimentazione sul campo di 36 mesi dimostra una buona efficacia del trattamento con perossido di idrogeno nel controllo di Legionella. In particolare, il nuovo dosaggio di perossido a 25 mg/L con l'aggiunta di polifosfati sembra proporsi come valida alternativa alla più frequente associazione con sali d'argento. Complessivamente i nostri dati suggeriscono che l'efficacia del perossido è evidente nel lungo periodo. Nelle prime fasi del trattamento alcune specie di Legionella, generalmente le ambientali (*L.spp*) possono resistere, adattarsi e sostituirsi a *L. pneumophila*, specie tra l'altro meno patogene e per il momento quasi mai risultate associate a patologia umana. Tuttavia, il mantenimento di livelli del disinfettante nella rete idrica maggiori di 20 mg/L porta progressivamente all'eliminazione di tutti i tipi del batterio, azzerando la carica rilevabile. Come per gli altri metodi di disinfezione, il mantenimento di una concentrazione adeguata e ininterrotta di perossido di idrogeno è molto importante per l'efficacia del trattamento; dai nostri dati possiamo affermare che livelli di 25 mg/L assicurano un buon controllo della colonizzazione di Legionella. Questo studio sembra quindi dimostrare che il perossido di idrogeno può rappresentare una valida alternativa ai disinfettanti a base di cloro, con risultati almeno paragonabili dal punto di vista dell'efficacia e l'interessante vantag-

gio di un minor costo sia in termini diretti (costi di installazione, costi dei componenti) che indiretti (riduzione dei livelli di corrosione delle tubature e, di conseguenza, degli interventi di manutenzione sull'impianto).

*Bibliografia su richiesta*

<sup>(1)</sup> [Dipartimento di Ricerca Traslationale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia, Università di Pisa]

<sup>(2)</sup> [Direzione Medica di Presidio, Presidio Ospedaliero di Piombino, Azienda USL Toscana nord ovest]

<sup>(3)</sup> [Igiene Sanità Pubblica e Nutrizione, Zona Val di Cornia, Azienda USL Toscana nord ovest]

**Il cleaning pensato per chi lavora.**

**REVOLUTION**

sorma

Macchine e prodotti per il cleaning / Competenza ed esperienza sul campo / Formazione degli operatori

20136 Milano / Via Gian Galeazzo 2 / +39 02 87366140 / info@sormaeurope.it

www.sormaeurope.it