

# Università degli Studi di Napoli "Federico II"

XXIX Ciclo di Dottorato in Sanità Pubblica e Medicina Preventiva

"Caratterizzazione di aerosols contenenti  
Legionella spp., al variare delle condizioni  
sperimentali in ambienti confinati"

ANNO ACCADEMICO 2016/2017

Candidato  
Dott. Giuseppe Gargiulo

Coordinatore  
Prof. Stefania Montagnani

Tutor  
Prof. Marco Guida

## SOMMARIO

1 - Introduzione.....	4
2 - Microbiologia .....	7
2.1 - Tassonomia .....	7
2.2 - Caratteristiche.....	8
3 - Habitat e diffusione.....	10
3.1 - Ambiente naturale .....	11
3.1.1 – Biofilm.....	13
3.2 - Ambiente artificiale.....	15
3.2.1 - Impianti idrici .....	15
3.2.2 - Impianti di condizionamento dell’aria .....	18
3.2.3 – Piscine, fontane e stabilimenti termali.....	20
4 - Epidemiologia.....	21
4.1 - Generalità.....	21
4.2 - Modalità di trasmissione.....	25
4.3 - Mortalità e tassi di incidenza .....	27
5 -Patologia .....	29
6 - Cenni legislativi.....	33
7 - Materiali e metodi.....	34
7.1 - Protocollo analitico .....	34
7.2 - Condizioni sperimentali.....	36
7.2.1 - Nebulizzatore .....	37
7.2.2 - Doccia a circuito chiuso.....	39
7.3 - Campionamento.....	40

7.3.1 - Impatto su agar .....	40
7.3.2 - Filtrazione su membrana.....	42
7.3.3 - Sedimentazione passiva .....	44
7.4 - Isolamento e conferma .....	45
8 - Risultati.....	47
9 - Discussione.....	53
10 - Conclusioni .....	66
Indice delle tabelle .....	68
Indice delle figure.....	69
Indice dei grafici .....	70
Bibliografia .....	71

Il verificarsi di casi di legionellosi e l'incremento di polmoniti ad essi imputabili in turisti che hanno soggiornato in alberghi e villaggi Italiani, unitamente al recente focolaio verificatosi a Parma in ottobre 2016, pone la Sanità Pubblica di fronte al problema della prevenzione comunitaria e nosocomiale, delle infezioni da Legionella.

Come noto questi microrganismi colonizzano l'ambiente acquatico, in particolare le condutture di acqua calda sanitaria e gli scambiatori di calore degli impianti di climatizzazione o torri ad evaporazione in ambienti antropici. La prevenzione della legionellosi dunque, deve tenere presente in modo prioritario la gestione del rischio proveniente dalla mancata applicazione di norme di buona pratica per la manutenzione degli impianti idrici, nonché tutte le forme di diffusione e contagio dell'organismo stesso.

Un approccio sistematico alla prevenzione della legionellosi deve tener conto di due realtà distinte; da una parte quella rappresentata dagli ospedali e dai complessi di cura ed assistenza di persone malate che presentano fattori di rischio individuali altamente implicati nella patogenesi della malattia polmonare da *Legionella*, dall'altra si identifica la situazione di molte infrastrutture che accolgono un numero considerevole di persone che si espongono ad un rischio collettivo. In questa situazione annoveriamo tutti i complessi alberghieri, turistici e di svago.

Il problema non è di facile ed immediata soluzione, e consiste nel concetto di rischio biologico, ovvero la definizione di quel confine biologico che consente al batterio di infettare, crescere e moltiplicarsi in un organismo umano.

Recentemente ad Ottobre 2016, si è registrata un'Epidemia da Legionella che ha coinvolto ben 42 persone in meno di un mese. E' stato possibile individuare la zona del contagio tramite informazioni recuperate dagli ammalati; tale area è un quartiere di Parma, "Montebello".

Ad oggi ancora non si è scoperta la fonte né le modalità di infezione ma sicuramente riferiscono le istituzioni, è avvenuto per via aerea. Dapprima sono state indagate le torri di evaporazione di una banca e delle poste, poi altre strutture pubbliche e private presenti nei dintorni del quartiere sono state sottoposte ad indagini analitiche, tutte risultate con valori entro i limiti prestabiliti dalla legge. Intanto non è stato possibile individuare la fonte dell'epidemia poiché ancora non si è tipizzato il batterio isolato dai campioni clinici accertati, al fine di tracciarlo poi nell'ambiente. Le linee guida per il controllo e la prevenzione della Legionellosi derivanti dall'accordo tra Stato, Regioni e province autonome di Trento e di Bolzano, non forniscono alcuna indicazione utile al fine di campionare e monitorare la diffusione del germe per via aerea, poiché non vi sono studi inerenti il campionatore, la distanza dalla fonte, il terreno di coltura (agar) da utilizzare, o gli effetti di alcune procedure analitiche non applicabili al campionamento di aerosols.

La presente sperimentazione vuole fornire, supportata da una normativa specificatamente rivolta ai vari settori di intervento (igienistico, clinico ed ambientale) per quanto concerne l'isolamento del germe, un quadro preliminare delle conoscenze sul campionamento e diffusione della Legionella attraverso Aerosol, al fine di garantire provvedimenti che sono ad

oggi i più collaudati, ma non certamente esaustivi verso tutti i fattori che sono causa di infezione, siano essi chimico–fisici o biologici.

## 2 - MICROBIOLOGIA

### 2.1 - TASSONOMIA

Il genere *Legionella* comprende microrganismi acquatici è costituito da batteri a forma di bastoncello, mobili per mezzo di uno o più flagelli polari o laterali appartenenti alla famiglia delle Legionellaceae.

Attualmente al genere *Legionella* appartengono 59 specie suddivise in oltre 70 sierogruppi e circa la metà di queste risultano patogene opportuniste. La specie *pneumophila* comprende 16 sierogruppi ed è quella maggiormente implicata nella patologia. Si stima infatti che *L. pneumophila* sia responsabile di oltre il 90% dei casi, ed in particolare il sierogruppo 1 di oltre l'84%, seguita da *L. longbeachae* (3,9%) e *L. bozemanai* (2,4%), mentre altre specie, meno frequentemente isolate in campioni clinici sono *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. feeleyi*, *L. wadsworthii* e *L. anisa* (2,2% in totale).

Le specie, circa 42, non possono essere identificate solamente in base ai loro profili biochimici poiché spesso risultano molto simili tramite indagini sierologiche, ibridazione del DNA cromosomiale o mediante l'analisi chimica degli acidi grassi a catena ramificata; per questi markers è possibile infatti solo distinguerle per raggruppamenti.

## 2.2 - CARATTERISTICHE

Legionella è l'unico genere della famiglia delle Legionellaceae. Si tratta di sottili bacilli Gram-negativi, aerobi, asporigeni, generalmente mobili per la presenza di uno o più flagelli; di dimensioni variabili da 0,3 a 0,9  $\mu\text{m}$  di larghezza e da 1,5 a 5  $\mu\text{m}$  di lunghezza, mentre in coltura sono frequenti forme filamentose lunghe fino a 20  $\mu\text{m}$



(Figura 1 Legionella

Figura 1 Legionella pneumophila al S.E.M.

pneumophila al S.E.M.).

La parete cellulare di questi microrganismi è caratterizzata dalla presenza di acidi grassi a catena ramificata di solito non presenti nei batteri Gram-negativi.

Dal punto di vista biochimico le legionelle sono relativamente inerti: non presentano alcuna attività fermentativa degli zuccheri, la maggior parte delle specie è gelatinasi positiva e mostra una debole attività ossidasica e catalasica. Come fonte energetica le legionelle utilizzano diversi aminoacidi, tra cui cisteina, arginina, isoleucina e metionina, e la loro crescita è stimolata da composti del ferro. Alcune specie di Legionella sono autofluorescenti: ad esempio *L. bozemanii*, *L. dumoffi* e *L. gormanii* mostrano una fluorescenza blu-bianca se



illuminate da luce UV, non lo sono invece *L.pneumophila* e *L. micdadei*. Le legionelle non crescono sui comuni terreni di coltura ma ne richiedono di specifici.

Dal punto di vista antigenico la loro struttura è caratterizzata dalla presenza di antigeni di superficie che ne permettono la classificazione in sierogruppi indicati con numeri romani.

Sono microrganismi difficilmente coltivabili che richiedono terreni contenenti L-cisteina, sali di ferro, carbone attivo ed estratto di lievito e che possono essere resi selettivi mediante l'aggiunta di antibiotici ed antimicotici.

La facilità con cui *Legionella* si riproduce nell'ambiente naturale, in contrasto con la difficoltà a crescere sui terreni di coltura artificiali, è in buona parte dovuta alla capacità di questo batterio di moltiplicarsi all'interno di protozoi ciliati (*Tetrahymena* ad esempio) ed amebe (*Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella*, ecc.), che costituiscono una fonte di nutrimento e di protezione dalle condizioni ambientali sfavorevoli (temperatura ed acidità elevate, presenza di biocidi, ecc.), grazie anche alla capacità delle amebe di produrre forme di resistenza come le cisti.

All'interno di ambienti acquatici, la *Legionella* può trovarsi sia in forma libera nell'acqua che ancorata al biofilm, cioè ad una pellicola di microrganismi (batteri, alghe, protozoi, ecc.) immersi in una matrice organica, in cui il batterio trova sostentamento e riparo da concentrazioni di biocidi che altrimenti sarebbero in grado di uccidere o inibire le forme a vita libera.

Le Legionelle sono sempre state isolate in ambiente umido e mai in ambiente secco. Sono associati all'acqua superficiale, termale e a quella delle apparecchiature dell'aria condizionata, ma sono state comunque riscontrate anche nell'acqua potabile in modo particolare annidate nei rubinetti, docce e nebulizzatori di ambienti ospedalieri.

Legionelle sono state isolate da campioni di masse d'acqua anche stagnanti a temperature comprese fra 57 e 63°C e a pH compresi tra 5,4 e 8,1 (laghi, fiumi, corsi d'acqua, acque termali).

La loro moltiplicazione sembra essere favorita da temperature comprese tra i 35 e i 45°C, condizione riscontrabile nelle acque termali, dal ristagno delle acque e dalla formazione di sedimento e/o di presenza di sostanze biodegradabili.

L'isolamento di *Legionella spp.* da reti dell'acqua potabile indica la capacità di sopravvivenza ai normali processi di potabilizzazione. Dal punto di vista ecologico è estremamente interessante la capacità di questo microrganismo di riprodursi nell'ambiente naturale, in contrasto con la sua difficoltà a crescere su terreni di coltura artificiali.

Detta capacità è in buona parte spiegata dai rapporti mutualistici che *Legionella* intrattiene con alcune specie di alghe verdi-azzurre (Cianobatteri) di acqua dolce, le quali favorirebbero la persistenza, la sopravvivenza e lo sviluppo del microrganismo negli habitat acquatici, come pure con amebe (*Naegleria* e *Acanthamoeba*) che verrebbero parassitate dal batterio stesso. Dal canto loro microrganismi ambientali quali *Bdellovibrio bacteriovorus*, esibendo attività litica verso le legionelle, potrebbero giocare un determinato ruolo nella purificazione ambientale.

Dall'habitat acquatico, che rappresenta il principale serbatoio ambientale naturale di *Legionella*, i microrganismi passano in ambienti antropici (impianti idrici, impianti di

condizionamento dell'aria, piscine, fontane), in grado di realizzare così situazioni ottimali per la loro riproduzione e propagazione.

### 3.1.1 – BIOFILM

I biofilm sono usualmente trovati su substrati solidi sommersi o esposti ad alcune soluzioni acquose, sebbene possano anche formarsi come tappeti o masse galleggianti su superfici liquide. Se è rifornito di risorse sufficienti per la crescita un biofilm crescerà fino a diventare macroscopico in poco tempo. I biofilm di solito consistono di molte specie di batteri e archaea. Un biofilm contenente differenti specie prende solitamente il nome di consorzio batterico, ed è quantitativamente più frequente di biofilm composti da singole specie, più rari e possibili solo a determinate condizioni. Ogni specie in esso presente svolge differenti funzioni metaboliche e presenta

solitamente diverso trofismo, richieste di ossigeno o nicchia ecologica. In questo modo si ha più efficienza senza che le diverse specie entrino in conflitto tra loro

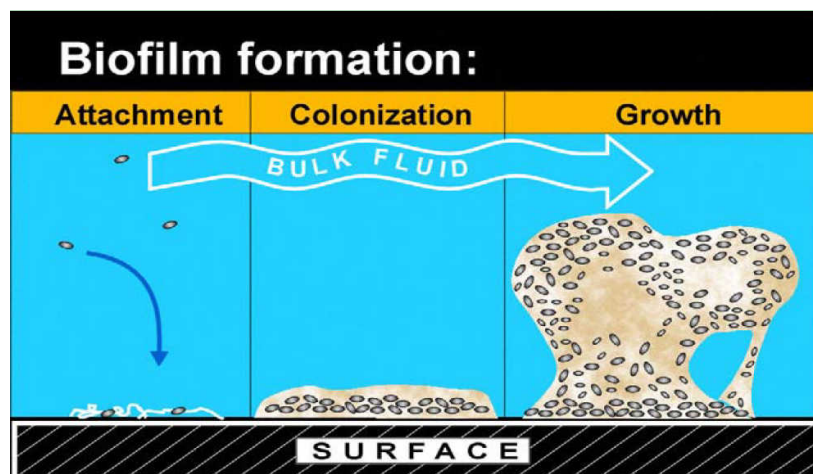


Figura 2 Formazione di biofilms su superfici

Il biofilm è tenuto insieme e protetto da una matrice di composti polimerici escreti detti mucopolisaccaridi. Questa matrice è tanto resistente in certe condizioni che può andare in contro a processi di fossilizzazione. La matrice protegge le cellule all'interno e facilita la comunicazione tramite segnali chimici o fisici. In alcuni biofilm sono stati rinvenuti canali d'acqua che contribuiscono a distribuire i nutrienti e le molecole segnale. Allo stesso modo questi canalicoli convogliano verso la periferia sostanze di scarto ed eventuali esotossine.

I batteri che compongono un biofilm solitamente hanno proprietà significativamente differenti dai batteri delle stesse specie che vagano liberamente, poiché l'ambiente denso e protetto del film permette loro di cooperare e interagire in varie maniere. Un beneficio di questo ambiente è l'aumentata resistenza a detersivi, antibiotici e disinfettanti, dato che la densa matrice extracellulare e lo strato esterno delle cellule protegge la parte interna della comunità. In alcuni casi la resistenza agli antibiotici può aumentare di 1000 volte.

## 3.2 - AMBIENTE ARTIFICIALE

---

### 3.2.1 - IMPIANTI IDRICI

Esistono prove sicure che *Legionella pneumophila* ha la capacità di moltiplicarsi nell'acqua (specialmente in quella calda) dei sistemi di distribuzione dell'acqua potabile, sia di grandi dimensioni (a livello di ospedali, alberghi, ecc.) sia di piccole dimensioni (a livello di case private).

Contribuirebbero a ciò fattori fisici e biologici, quali un'adatta temperatura, un lungo tempo di ritenzione, la formazione di sedimento, la presenza di biofilm a livello delle superfici interne di tubature o serbatoi, la presenza di sostanze biodegradabili derivate da parti in gomma o in silicone.

Per quanto detto, ne deriva che negli impianti di distribuzione dell'acqua quanto maggiore è la distanza tra la fonte di calore ed il punto di erogazione dell'acqua, tanto maggiore è la pericolosità dell'impianto stesso ai fini della diffusione dell'agente infettivo.

Il microrganismo della specie *Legionella Pneumophila* può trovare dunque condizioni ideali per moltiplicarsi negli impianti idrici all'interno degli edifici e diventare un pericolo per la salute umana.

Per individuare il più corretto e adeguato trattamento di sanificazione è necessario considerare fattori quali la "tipologia di impianto (ACS/raffreddamento/umidificazione/vasca

ornamentale), tipologia di materiali impiegati (zincato, PE, PVC, multistrato, inox.), presenza di incrostazioni, corrosioni, biofilm, grado di contaminazione dell'impianto, possibilità di formazione sottoprodotti di disinfezione, semplicità di impiego e monitoraggio, costo d'investimento iniziale (costo impianto e materiali), nonché costi di gestione.

In realtà ogni tecnica di sanificazione possiede aspetti positivi e negativi che l'esperienza di quest'ultimo decennio ha consentito di mettere in evidenza: comunque l'impiego di tecniche di sanificazione "deve rientrare in un processo più ampio di analisi dei rischi comprensivo di identificazione e valutazione dei rischi.

Un metodo di sanificazione è lo "shock termico", cioè l'aumento della temperatura dell'acqua calda a 70-80°C continuativamente per 3 gg. con scorrimento per 30 min (temperatura minima ai punti distali 60°C); esso però implica la necessità di interventi frequenti, vi è ricrescita batterica nel periodo tra due risanamenti, non sempre applicabile (centrali termiche non adeguate), richiede tempo e personale per il controllo del rischio ustioni, può innescare processi di incrostazione, può avere un'azione corrosiva che si ripercuoterebbe sul costo per la manutenzione degli impianti.

Per sanificare è possibile usare anche l'ipoclorito di sodio mediante una iperclorazione shock o una iperclorazione continua, di contro vi sarebbe la necessità di interventi frequenti; inoltre l'azione disinfettante è minima al di sopra dei 30°C ed ha un'efficacia limitata sul biofilm. Il trattamento per iperclorazione induce la formazione di sottoprodotti (THM) avendo una concentrazione di cloro non compatibile con quella utilizzata per l'acqua potabile: 0,2 mg/l. Apparentemente sembrerebbe un'operazione conveniente, ma avendo una forte azione corrosiva comporta un aumento del costo di manutenzione degli impianti.



Un altro prodotto utilizzato è il biossido di cloro, un gas instabile che viene prodotto in loco mediante un generatore; questo ha una buona attività ed efficacia anche sul biofilm, anche se non gestito correttamente potrebbe comportare una possibile formazione di sottoprodotti: cloriti / clorati oltre limiti D.L. 31/01. Rappresenta costi di investimento e manutenzione elevati anche a causa della forte azione corrosiva, e comporta anche problemi di sicurezza (gas esplosivo), anche se oggi la tecnologia ci offre impianti automatizzati sicuri.

L'ultrafiltrazione, ricordando che può essere effettuata al POE (Point of Entry) o più frequentemente al POU (point of use) per la protezione di specifiche utenze ad alto rischio, si comporta come una efficace barriera fisica (grado di filtrazione  $< 0.2 \mu\text{m}$ ); essa agisce solamente nel punto di utilizzo (nessuna protezione residua) e non protegge la rete di distribuzione, solitamente la presenza di depositi nell'acqua calda riduce la durata del filtro che necessita di sostituzioni frequenti (circa 15-30 gg). Per tali motivi risulta estremamente costoso (solo per utenze limitate a forte rischio).

---

### 3.2.2 - IMPIANTI DI CONDIZIONAMENTO DELL'ARIA

Le sezioni caldo-umide dei sistemi di raffreddamento per il condizionamento dell'aria e gli umidificatori della stessa, nei sistemi di ventilazione, costituiscono una nicchia ecologica rilevante quali veicoli di diffusione di *Legionella spp.*

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), a conclusione di una serie di studi realizzati negli ultimi vent'anni da gruppi di ricercatori di nazioni diverse a latitudini differenti, su lavoratori con compiti e ritmi di lavoro confrontabili ma non sovrapponibili, ha dimostrato come le contaminazioni chimico-biologiche derivanti dagli impianti di climatizzazione scarsamente igienizzati siano una delle principali cause di vari tipi di patologie afferenti la salute umana, tra le quali vanno certamente annoverate:

- La Sick Building Syndrome (Sindrome dell'Edificio Malsano), che non è imputabile ad un agente etiologico individuabile e che presenta sintomi quali astenia, cefalea, tosse, senso di costrizione toracica, irritazione delle mucose e della cute, bruciore ed arrossamento degli occhi. Tale sintomatologia si manifesta in un'alta percentuale dei soggetti esposti ed è cronologicamente associata all'attività lavorativa, poiché spesso si attenua o si risolve con l'allontanamento dall'ambiente malsano.
- Le Building Related Illness (Malattie correlate agli edifici), ovvero quelle patologie causate da batteri, miceti, virus e quelle derivanti da polveri e contaminanti chimici. Tali patologie, assai più gravi della precedente, presentano un quadro clinico generalmente uniforme, una eziologia ben identificata, segni clinici e di laboratorio

definiti, recupero prolungato nonostante l'allontanamento dall'edificio e la necessità di rimuovere l'agente contaminante al fine di ottenere la guarigione del paziente. A questo gruppo di patologie, oltre alla famigerata "Sindrome del Legionario" o Legionellosi, sono ad esempio riconducibili malattie allergiche quali l'alveolite allergica estrinseca e l'asma bronchiale.

---

### 3.2.3 – PISCINE, FONTANE E STABILIMENTI TERMALI

Sono sistemi in cui l'acqua viene spruzzata nell'aria con getti meccanici ed è poi raccolta in vasche artificiali. Collocate all'aperto o in ambienti chiusi, ad esempio in centri commerciali, fiere, halls di alberghi o piazze pubbliche.

Le temperature che favoriscono lo sviluppo della legionella possono essere raggiunte all'aperto con l'aiuto degli apporti termici del sole, e al chiuso con il contributo di fonti interne di calore quali: il riscaldamento e l'illuminazione. Possono inoltre contribuire al riscaldamento dell'acqua anche le stazioni di pompaggio e di filtrazione.

Gli stabilimenti termali possono offrire alla legionella condizioni ideali di sviluppo. In particolare, si riscontrano temperature favorevoli e abbondanti sostanze nutritive che derivano dall'alta densità di utilizzo delle vasche termali; tali sostanze sono costituite da cosmetici, frammenti di pelle, batteri vari, funghi e altri composti organici. In relazione al tipo di acque termali e al loro ciclo di utilizzo, è pertanto consigliabile prendere in esame anche la possibilità di adottare adeguati sistemi di disinfezione, laddove siano utilizzabili.

Alcune epidemie di legionellosi sono state imputate all'utilizzo di acqua riscaldata, contaminata da *Legionella pneumophila* in vasche da idromassaggio e/o piscine. Tale situazione, se da un lato induce ad ipotizzare l'inadeguatezza dei sistemi di clorazione/pulizia dei filtri, dall'altra riconferma il ruolo critico e la resistenza di *Legionella spp.* a stress ambientale rispetto alla maggior parte degli altri microrganismi acquatici.

## 4 - EPIDEMIOLOGIA

### 4.1 - GENERALITÀ

“Legionellosi” è la definizione di tutte le forme morbose causate da batteri gram-negativi aerobi del genere *Legionella*. Essa si può manifestare sia in forma di polmonite, sia in forma febbrile extrapolmonare o in forma subclinica. La specie più frequentemente coinvolta in casi umani è *Legionella pneumophila*. Oltre a *L. pneumophila*, di cui si conoscono 15 sierogruppi differenti, sono state isolate altre specie di legionella nel corso di infezioni nell'uomo, quali *L. micdadei* e *L. feeleii* (entrambe responsabili di casi sporadici di pneumopatia acuta), *L. bozemanii*, *L. jordanis* e *L. hackeliae* (tutte responsabili, probabilmente, sia di casi di pneumopatia sia di febbre di Pontiac). L'infezione colpisce la popolazione in generale, producendo malattia in particolar modo nelle persone con deficit immunitario dovuto all'età, a patologie intercorrenti o a particolari condizioni tra cui l'ospedalizzazione.

L'unico serbatoio naturale di *Legionella* è l'ambiente. Dal serbatoio naturale (ambienti lacustri, corsi d'acqua, acque termali) il batterio passa nei siti che costituiscono il serbatoio artificiale (acqua condotta cittadina, impianti idrici dei singoli edifici, piscine ecc.).

La malattia è ubiquitaria e può manifestarsi con epidemie dovute ad un'unica fonte con limitata esposizione nel tempo e nello spazio all'agente microbico, oppure con una serie di casi indipendenti o sporadici senza un evidente raggruppamento temporale o geografico.

Focolai epidemici si sono verificati in ambienti collettivi a residenza temporanea, come ospedali o alberghi. I casi di origine comunitaria di malattia polmonare si manifestano prevalentemente nei mesi estivo-autunnali, mentre quelli di origine nosocomiale non presentano una particolare stagionalità. I dati epidemiologici italiani in nostro possesso mostrano come i casi di legionellosi, sia comunitari che nosocomiali, siano di natura sporadica e raramente di natura epidemica.

Gli studiosi di *Legionella* hanno messo in evidenza che, nonostante l'ubiquitarietà del microrganismo, le infezioni da esso sostenute hanno la caratteristica di raggrupparsi in definite aree geografiche e di prediligere i grandi edifici di servizio pubblico, dove, in un primo momento, si credette di aver individuato un possibile serbatoio di infezione nei sistemi di raffreddamento per evaporazione dei grandi impianti di condizionamento dell'aria e un mezzo di trasmissione negli aerosol che si originavano.

Questa ipotesi è stata dimostrata valida per alcune epidemie verificatesi in America, come quelle avvenute a Pontiac, Memphis, Eau Claire, mentre in altri casi l'associazione è più equivoca e l'isolamento di *Legionella pneumophila* potrebbe riflettere soltanto una diffusa contaminazione ambientale, di cui gli impianti sarebbero siti occasionali.

In Italia, i casi di malattia sembrano più frequentemente correlati alla presenza di *Legionella* nell'acqua degli impianti idrici, sebbene sia stato finora individuato un solo caso di epidemia generata da impianti di raffreddamento dell'acqua dei sistemi centralizzati di condizionamento dell'aria.

Come già accennato, i fattori predisponenti alla malattia sono l'età avanzata, il fumo di sigaretta, la presenza di malattie croniche, l'immunodeficienza (vedi Tabella1). Il rischio di

acquisizione della malattia è principalmente correlato alla suscettibilità individuale del soggetto esposto e al grado di intensità dell'esposizione, rappresentato dalla quantità di *Legionella* presenti e dal tempo di esposizione. Sono importanti inoltre la virulenza e la carica infettante dei singoli ceppi di *Legionella*, che, interagendo con la suscettibilità dell'ospite, possono determinare l'espressione clinica dell'infezione.

La virulenza della *Legionella* potrebbe essere aumentata dalla replicazione del microrganismo in alghe e protozoi presenti nell'ambiente acquoso.

Delle circa 42 specie di *Legionella*, non tutte sono state associate alla malattia nell'uomo. La specie più frequentemente rilevata nei casi con diagnosi di polmonite risulta essere *L. pneumophila*.

Al momento è comunque difficile stabilire quale sia la dose infettante per l'uomo e, conseguentemente, non si ritiene utile, ai fini epidemiologici definire concentrazioni infettanti di *Legionella* in termini assoluti. Viaggi e soggiorni in alberghi sono importanti fattori di rischio che vanno considerati in aggiunta a quelli già sopra menzionati.

Fattori di rischio	Malattie di base
Età avanzata	Broncopneumopatia cronica ostruttiva
Sesso maschile	Immunosoppressione:
Tabagismo	Neoplasie e interventi chirurgici ORL
Alcoolismo	Insufficienza renale
Sonda nasogastrica alimentazione con sondino	Trapianto d'organo
Inalazione di acqua contaminata	Terapia corticosteroidica

Tabella 1 - Fattori di rischio e malattie di base che favoriscono il contagio da Legionella spp.



## 4.2 - MODALITÀ DI TRASMISSIONE

La legionellosi viene acquisita per via respiratoria mediante inalazione di goccioline di aerosol contenenti i batteri.

Oltre tramite l'aerosolizzazione, le goccioline si possono formare anche attraverso spruzzi con gorgoglii o per impatto dell'acqua su superfici solide, oppure direttamente ingerendo acqua contaminata. Più piccole sono le dimensioni delle gocce più queste sono pericolose, in quanto con diametro inferiore a 5 $\mu$ m raggiungono facilmente le basse vie respiratorie.

Da quanto sopra esposto, emerge che le principali fonti di infezione per l'uomo sembrano essere gli impianti idrici e gli impianti per il condizionamento dell'aria. Si può ritenere che l'esistenza di un serbatoio di accumulo con acqua contaminata sia la prima condizione necessaria al verificarsi di infezioni umane, unitamente a:

- esistenza di meccanismi "amplificanti", che consentano un significativo incremento della concentrazione del microrganismo
- efficacia del meccanismo di disseminazione dal serbatoio
- virulenza dello stipite disseminato
- introduzione del microrganismo attraverso una via adeguata
- recettività dell'ospite.

Mentre in alcuni casi l' infezione è stata attribuita a sostanze aerodisperse contenenti batteri provenienti da torri di raffreddamento o condensatori evaporativi o sezioni di umidificazione delle unità di trattamento dell'aria, altre infezioni sono risultate causate dalla contaminazione di impianti di acqua potabile, apparecchi sanitari, fontane e umidificatori ultrasonici. I principali sistemi generanti aerosol che sono stati associati alla trasmissione della malattia comprendono gli impianti idrici, di climatizzazione dell'aria (torri di raffreddamento, sistemi di ventilazione e condizionamento dell'aria, ecc.), apparecchiature per la terapia respiratoria assistita e gli idromassaggi.

Sono stati inoltre segnalati in letteratura casi di legionellosi acquisiti mediante aspirazione o microaspirazione di acqua contaminata e attraverso la contaminazione di ferite. Attualmente non è stato possibile dimostrare la trasmissione interumana dell'agente, né, al momento viene ipotizzata.

Modalità	Fonte
Ventilazione forzata	Contaminazione circuito di ventilazione
Aspirazione forzata	Sonda nasogastrica
Aerosol	Torri di raffreddamento
	Apparecchi per aerosol ed ossigenoterapia
	Umidificatori
	Impianti termali e parchi pubblici
	Piscine, palestre

Tabella 2 Principali modalità di trasmissione della Legionella spp.

### 4.3 - MORTALITÀ E TASSI DI INCIDENZA

La letalità per malattia da legionella è del 5-15%. La mortalità si conferma elevata, sia nei casi di legionellosi acquisita in comunità, dove il tasso di decessi è circa il 20%, ma ancor più nei casi di infezione contratta in ospedale dove, proprio a causa del grave stato di salute dei pazienti ricoverati, raggiunge il 40%.

Secondo alcuni autori la *Legionella* è responsabile dell'1-5% dei casi totali di polmonite comunitaria e del 3-20% di tutte le polmoniti nosocomiali. Applicando queste percentuali al numero totale di polmoniti nosocomiali che si verificano ogni anno in Italia si otterrebbe un numero di casi di malattia almeno dieci volte superiore a quello attualmente notificato.

Nel Nord America si stima che la proporzione dei casi ospedalieri sia al massimo del 14% rispetto ai casi non ospedalieri. Tuttavia, poiché è difficile distinguere una polmonite da *Legionella* da altre polmoniti sulla base del solo quadro clinico, ci si attende un numero sicuramente superiore di casi non ospedalieri in quanto la diagnosi sierologica o microbiologica non viene estesa a tutti i casi di polmonite contratta fuori dall'ospedale.

Il tasso medio europeo di incidenza, nel 1997, delle polmoniti da *Legionella* è stato di 3,9 casi per milione di popolazione. L'Italia si colloca ben al di sotto della media con un tasso d'incidenza di 1,4 casi per milione di abitanti.

Numerosi studi dimostrano che la legionellosi è sia sotto notificata che sotto diagnosticata, di conseguenza il tasso d'incidenza della Danimarca, pari a 24 casi per milione di popolazione, potrebbe essere molto vicino al reale tasso di incidenza nei paesi europei.

In Italia negli ultimi anni sono stati notificati mediamente un centinaio di casi di legionellosi ogni anno di cui oltre la metà viene registrata in 4 regioni: Liguria, Lombardia, Piemonte, Trentino Alto Adige, mentre solo un numero molto limitato di casi viene segnalato dalle regioni del sud Italia.

Gli eventi di infezione nosocomiale rappresentano mediamente il 20-30% del totale e oltre il 50% dei pazienti presenta altre patologie concomitanti, prevalentemente di tipo cronico-degenerativo.

I batteri, penetrati nell'organismo attraverso le mucose delle prime vie respiratorie, giungono negli spazi alveolari ove determinano un interessamento alveolo-bronchiale più o meno intenso, cui può far seguito una vera e propria polmonite alveolare.

Le Legionelle, per il loro spiccato tropismo intracellulare, penetrano e si moltiplicano all'interno dei macrofagi alveolari e sono anche responsabili di alterazioni della funzionalità dei linfociti T. Altre vie di introduzione dei germi diverse da quella inalatoria (gastro-enterica, parenterale) sono solo ipotizzate, ma non ancora sufficientemente dimostrate. L'infezione da *Legionella* può dar luogo ad un insieme di forme cliniche non ancora del tutto ben conosciute, ma che attualmente ci si limita a ricondurre a due condizioni fondamentali: la febbre di Pontiac e la legionellosi polmonare.

La **febbre di Pontiac**, è una malattia ad andamento benigno che, dopo un periodo di incubazione di 24-48 ore, si manifesta in forma acuta e si risolve in 2-5 giorni. Dapprima compaiono malessere generale, mialgie e cefalea, seguiti rapidamente da febbre, a volte con tosse e gola arrossata. Possono essere presenti diarrea, nausea e lievi sintomi neurologici quali vertigini o fotofobia.

La **legionellosi polmonare** si manifesta in genere dopo incubazione di 2-10 giorni (in media 5-6 giorni) con iniziale malessere, febbre piuttosto elevata, con interessamento polmonare a carattere lobare clinicamente di discreta o notevole gravità con possibile interessamento pluridistrettuale (neurologico, epatico, renale).

All'esame obiettivo del torace si apprezzano aree di addensamento parenchimale mono o bilaterali, con ipofonesi e presenza di rantoli crepitanti. Il reperto radiologico non è patognomonico ed a livello biochimico si osserva un lieve aumento delle transaminasi ed ipofosfatemia.

Tra le complicanze della malattia polmonare vi possono essere ascesso polmonare, empiema, insufficienza respiratoria, shock, coagulazione intravasale disseminata, porpora trombocitopenica ed insufficienza renale.

Quando presenti i sintomi extrapolmonari più frequenti sono a livello gastrointestinale, neurologico e cardiaco come descritto in Tabella 3.

Tra le polmoniti da *Legionella*, l'O.M.S. riserva la denominazione di "Malattia dei Legionari" alla polmonite epidemica sostenuta da *L. pneumophila* sierogruppo 1 come rilevato durante l'epidemia di Philadelphia del 1976.

La polmonite da *Legionella* non ha caratteristiche cliniche che permettano di distinguerla da altre forme atipiche o batteriche di polmonite. Tuttavia, le modalità di coinvolgimento degli organi extrapolmonari sono specifiche per la legionellosi e una diagnosi clinica presuntiva può essere fatta sulla base di una corretta associazione di segni e sintomi chiave.

Modalità	Fonte
<b>Neurologiche:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Confusione</li> <li>• Disorientamento</li> <li>• Letargia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insonnia</li> <li>• Allucinazioni</li> <li>• Delirio</li> <li>• Atassia</li> <li>• Ascesso cerebrale</li> <li>• Deficit neurologici focali</li> <li>• Amnesia retrograda</li> <li>• Convulsioni</li> <li>• Neuropatia periferica</li> <li>• Corea</li> <li>• Encefalomielite</li> <li>• Vertigini</li> <li>• Epatomegalia</li> <li>• Peritonite</li> <li>• Ascesso perirettale</li> <li>• Ascesso appendicolare</li> <li>• Pancreatite</li> <li>• Colite</li> <li>• Insufficienza renale</li> <li>• Insufficienza renale mioglobinurica</li> <li>• Nefrite acuta tubulointerstiziale</li> <li>• Ascesso renale</li> </ul>
<b>Gastrointestinali</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nausea</li> <li>• Vomito</li> <li>• Feci non formate/Diarrea</li> <li>• Dolore addominale</li> </ul>	
<b>Renali</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Proteinuria</li> <li>• Ematuria</li> </ul>	
<b>Orl</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nessuna</li> </ul>	
<b>Cardiache</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nessuna</li> </ul>	

	<ul style="list-style-type: none"><li>• Glomerulonefrite</li></ul>
<b>Tessuti molli</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• Nessuna</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Sinusite</li><li>• Miocardite</li><li>• Pericardite</li><li>• Effusione pericardica</li><li>• Torsione della punta</li><li>• Cellulite</li><li>• Ascesso cutaneo</li><li>• Infezione di ferite</li></ul>

Tabella 3 Manifestazioni extrapolmonari della legionellosi



Antecedenti alle attuali linee guida, i principali documenti di riferimento erano “Le Linee Guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi”, predisposte dal Ministero della Sanità ed adottate dalla Conferenza Stato Regioni il 4.4.2000.

Il 7 maggio 2015 sono state emanate le nuove Linee guida per il controllo e la prevenzione della legionellosi, ove vengono inclusi recenti dati epidemiologici, microbiologici, patologici, tassi di diffusione, metodi di analisi sia clinici che ambientali per l’isolamento della legionella ed indicazioni relative alle modalità di costruzione e gestione degli impianti, aeraulici od idrici, al fine di contenere il rischio.

Le linee guida derivanti dall’accordo Stato, Regioni e Province Autonome di Trento e di Bolzano, definiscono anche dei limiti di allerta e delle azioni da intraprendere al fine di minimizzare il rischio di infezione in base al tipo di “destinazione d’uso” del campione; sia essa derivata da impianti termali, vasche idromassaggio, torri di evaporazione o studi odontoiatrici.

Viene inoltre sottolineata l’importanza che ha l’aerosol nella diffusione del microorganismo patogeno, ma non viene indicato alcun metodo affidabile per la sua determinazione. Al contrario invece per sedimenti e biofilms, fonti di inquinamento cronico in quanto poco penetrabili da agenti disinfettanti, vengono indicati metodi di ricerca e quantificazione, proprio per limitare al minimo il rischio di potenziali focolai di infezione.

## 7 - MATERIALI E METODI

### 7.1 - PROTOCOLLO ANALITICO

Attraverso due forme di nebulizzazione artificiale, tramite doccia e nebulizzatore, e tre tecniche di campionamento di bioaerosol quali sedimentazione passiva, campionamento attivo ad impatto su agar e tramite filtrazione su membrana, si intende verificare la validità del metodo colturale per la ricerca di *Legionella* spp. in campioni ottenuti in laboratorio.

A tal scopo sono state utilizzate colture di *Fluoribacter dumoffii* (*Legionella dumoffii*) ATCC® 33279™ per la contaminazione del campione di prova, il quale consisteva in un'unica aliquota di 30 litri di soluzione fisiologica non sterile ad ogni ripetizione del ciclo di esperimenti. Al termine di ogni esperimento dello stesso ciclo, il campione veniva ulteriormente contaminato con un'altra coltura di *Legionella* a concentrazione nota, in modo da aumentarne la carica totale e procedere agli steps successivi. Le colture di *legionella* sono state preparate in BPW a 37°C, e la loro concentrazione è stata letta spettrofotometricamente a 600 nm prima di contaminare il campione, per derivarne il titolo necessario; da una lettura di 0,1 O.D. ne deriva una concentrazione di 10<sup>8</sup> ufc per ml.

Il campione di prova di 30 litri è stato impiegato per alimentare una doccia a circuito chiuso, e parallelamente una sua aliquota di 10 ml è stata nebulizzata con strumento idoneo, al fine di massimizzare il recupero dei microorganismi presenti nel campione stesso.

Le variabili considerate durante l'esecuzione dei tests sono state: la portata della nebulizzazione, la distanza dalla fonte, la concentrazione di legionella nel liquido nebulizzato e la modalità di campionamento. Attraverso vari cicli di esperimenti esplorativi si è potuto stabilire un gradiente di

contaminazione del campione che variava da  $3,0 \times 10^3$  ufc/L a  $1,2 \times 10^4$  ufc/L di *Legionella dumoffii*, scelta dettata anche dalla pericolosità del ceppo che, seppur

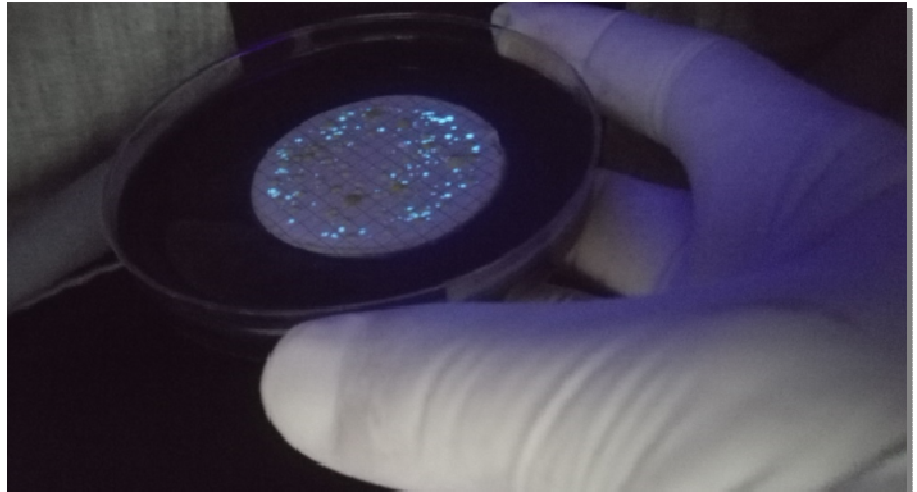


Figura 3 Legionella dumoffii isolata da un campione d'acqua, esposta a luce UV a 450nm

non appartenente al serovar *pneumophila*, è pur sempre patogeno.

Sono state nebulizzate a steps incrementali colture di  $3,0 \times 10^3$ ,  $6,0 \times 10^3$ ,  $9,0 \times 10^3$  e  $1,2 \times 10^4$  ufc/L di *Legionella dumoffii* attraverso una doccia a circuito chiuso ed un nebulizzatore, in ambienti separati; la doccia ha sempre erogato ad una pressione costante di 2 bar, il nebulizzatore ha erogato a 2 diverse portate, 1 ml ogni minuto e 35 secondi, ed 1ml ogni 3 minuti e 10 secondi. Per ogni portata e metodo di nebulizzazione, si è proceduto al campionamento ad una distanza dalla fonte di 50cm e 100cm con 3 diversi approcci: SAS ad impatto su agar, Filtrazione su membrana idrosolubile e sedimentazione passiva.

Un'aliquota del campione di 30 litri è stata prelevata ed analizzata (ISO 11731-2:2004) per ogni ciclo di esperimenti, al fine di confermare il titolo atteso (Figura 3 Legionella dumoffii isolata da un campione d'acqua, esposta a luce UV a 450nm).

## 7.2 - CONDIZIONI SPERIMENTALI

Tutte le prove sono state effettuate in ambienti chiusi e circoscritti di circa 4mq ove non è avvenuto alcuno spostamento d'aria, se non quello generato dalla fonte che nebulizzava il campione, o dal campionatore per aspirazione. Ad ogni ciclo di esperimenti i locali e le strumentazioni venivano sanificati con soluzione a 10 ppm di ipoclorito di sodio; la scelta degli ambienti per effettuare le prove infatti, è stata influenzata anche dalla possibilità di poter effettuare un'efficace sanificazione, ovvero dalla presenza di superfici lisce e quindi facilmente lavabili.

Nella scelta della distanza del campionatore dalla fonte, dati gli spazi necessariamente confinati e volutamente privi di alcuno spostamento d'aria al loro interno che avrebbe potuto ulteriormente veicolare l'aerosol, ci si è attenuti ad una distanza di 50 e 100cm; unica fonte di moto era rappresentata dagli strumenti utilizzati per creare l'aerosol, descritti ai paragrafi successivi. I campionatori infatti venivano azionati con un "delay time" necessario a far stabilizzare l'atmosfera interna, una volta abbandonato e chiuso il locale dei tests.

## 7.2.1 - NEBULIZZATORE

Il nebulizzatore utilizzato è un tipico strumento da laboratorio, nel quale il liquido viene aspirato per depressione generata da un flusso d'aria che scorre all'apice di un tubo di vetro; appena una minima quantità di liquido entra in

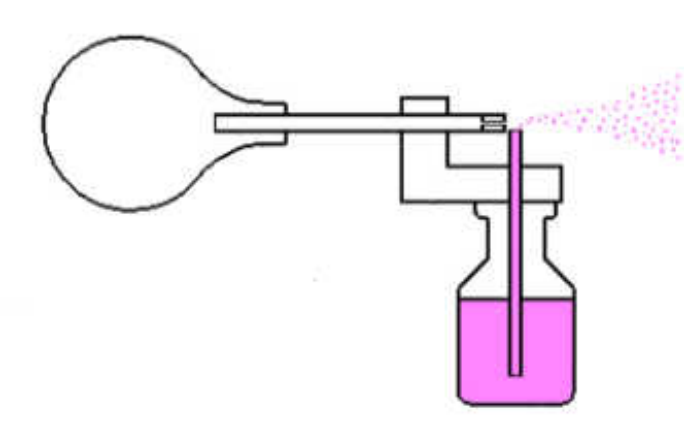


Figura 4 Funzionamento nebulizzatore



Figura 5 Nebulizzatore da laboratorio

contatto con il flusso, viene nebulizzato ed allontanato (Figura 4 Funzionamento nebulizzatore). È stato possibile impostare la portata della nebulizzazione grazie ad una pompa ad aria a velocità variabile collegata al nebulizzatore, e ad un rubinetto tra essi interposto che ne facilita ulteriormente la regolazione (Figura 5 Nebulizzatore da laboratorio).

Il campionamento è stato effettuato frontalmente alla base del nebulizzatore a due distanze diverse ed a due diverse

portate di nebulizzazione: 50cm e 100cm, e 1ml/1min35sec e 1ml/3min10sec. Il nebulizzatore è inclinato di 10° per una migliore diffusione dell'aerosol, in modo che avesse

una traiettoria semi parabolica e non arcuata verso il basso. Il campionamento attivo tramite SAS (§7.3.1 - Impatto su agar e §7.3.2 - Filtrazione su membrana) è stato effettuato in modo che venisse aspirato 1m<sup>3</sup> di aria in 3 minuti e 10 secondi, dunque ad entrambe le portate del nebulizzatore sono ampiamente bastati 10ml di campione che venivano sottratte dall'aliquota principale di 30 litri, per ogni concentrazione del campione.

## 7.2.2 - DOCCIA A CIRCUITO CHIUSO



Figura 6 Doccia a circuito chiuso

La doccia consiste in una vasca di Plexiglass di 80x60cm, al cui fondo è stato installato uno scarico collegato ad una pompa. Grazie alla spinta fornita dalla pompa l'acqua viene erogata da un soffione doccia ad una pressione costante di 2 bar. Grazie ad un telo impermeabile montato "ad imbuto aperto" ad una distanza di 50cm dal perimetro della doccia, l'acqua che fuoriesce dal soffione viene recuperata per caduta all'interno della vasca stessa. I campionamenti sono stati effettuati al di sotto del soffione dal lato aperto del telo, a due distanze diverse (50 e 100cm) dalla fonte rappresentata dal

sistema telo-soffione. La distanza tra il getto del soffione ed il telo è stata volutamente di 50cm al fine di generare quanto più aerosol, grazie all'impatto dell'acqua sul telo (Figura 6 Doccia a circuito chiuso).

## 7.3 - CAMPIONAMENTO

### 7.3.1 - IMPATTO SU AGAR

L'aria ed i microorganismi aero dispersi sono stati aspirati tramite una pompa, attraversando un cilindro metallico forato ed impattando su agar sottostante precedentemente preparato in una piastra rodac. In base al microorganismo da ricercare si



Figura 7 Campionatore SAS 90

utilizza solitamente agar di diversa composizione. Essendo l'agar gelatinoso dunque anche idratato, trattiene qualsiasi sospensione aerea dispersa prima di fluire al di sotto della



Figura 8 Campionatori utilizzati

pietra rodac, ove l'aria viene definitivamente aspirata ed espulsa dallo strumento. Grazie ai fori a distanza ravvicinata al di sopra dell'agar, è possibile un buon recupero

dell'aerosol (Figura 7 Campionatore SAS 90). Per le indagini sono stati utilizzati a supporto di un campionatore SAS 90, anche due campionatori SAS DUO 180 a doppia testata



e Figura 10 SAS Membrana e impatto). La portata di aspirazione impostata sui SAS è pari ad  $1\text{m}^3$  ogni 3min e 10 secondi.

### 7.3.2 - FILTRAZIONE SU MEMBRANA

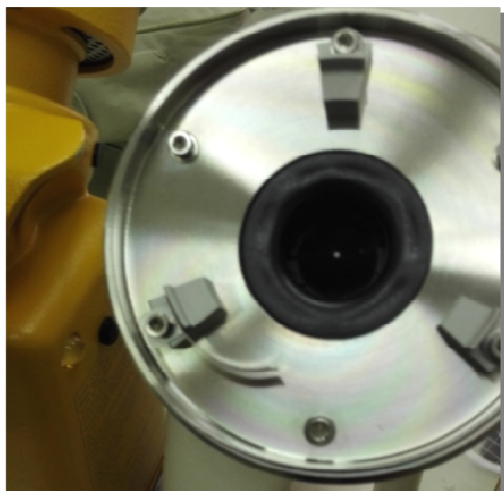


Figura 9 SAS per piastre RODAC

La filtrazione su membrana a differenza del campionamento ad impatto, permette all'aerosol di penetrare una membrana porosa alla quale aderiscono i batteri. Le membrane utilizzate sono le Sartorius Gelatine membrane filters (12602.50.ALK) che sono idrosolubili, pertanto il recupero dei microorganismi dal supporto è totale.

Per il campionamento sono state adattate le testate di due campionatori SAS DUO 180, in modo che il flusso d'aria attraversasse un supporto sterile poroso, sul quale viene posta la membrana bloccata con un anello. Il supporto poroso è stato fissato al campionatore grazie a comune plastilina, che ha garantito un ottimo posizionamento ed un'eccellente tenuta, grazie anche a degli anelli che sostengono perimetralmente la membrana adesa sul supporto



Figura 10 SAS Membrana e impatto

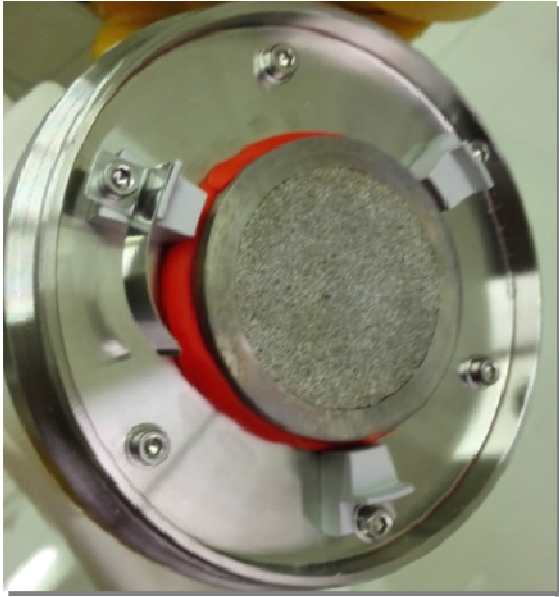


Figura 11 SAS modificato per membrana

(Figura 9 SAS per piastre RODAC Figura 10 SAS Membrana e impatto; Figura 11 SAS modificato per membrana) Le modifiche al campionatore sono state verificate rispetto al metodo ad impatto su agar per la determinazione della carica batterica mesofila totale a 30°C (ISO 4833-2:2013) campionando in contemporanea, senza avere esiti significativamente discordanti.

### 7.3.3 - SEDIMENTAZIONE PASSIVA

La sedimentazione passiva è uno dei primi metodi di campionamento dell'aria adoperati, ed in alcuni tests è ancora diffusa.

Consiste nel campionare ciò che si va a depositare per via gravimetrica (fall-out) sull'agar, all'interno di una piastra petri del diametro di 90 o 120 mm contenente agar specifico. E' ovvio che non si può avere una



misura della quantità d'aria che circola al di

Figura 12 Piastra petri utilizzata per tests di sedimentazione esplorativi

sopra della piastra: l'unica variabile di campionamento oltre alla distanza che in questo caso non è stata presa in considerazione, è il numero di piastre utilizzate al fine di aumentare la superficie esposta. In questo studio sono state utilizzate tre piastre poste a 50 centimetri di distanza dal sistema soffione-telo già citato (§ 7.2.2 - Doccia a circuito chiuso), in modo che non fossero "oscurate" dal sistema di ricircolo acqua.

## 7.4 - ISOLAMENTO E CONFERMA

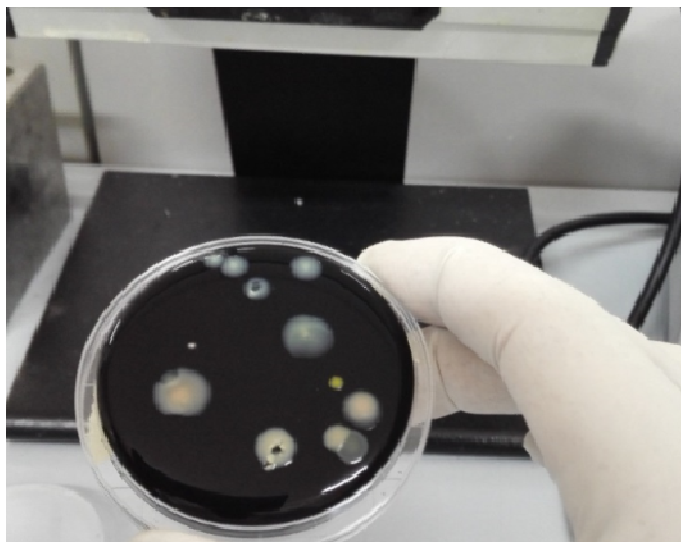


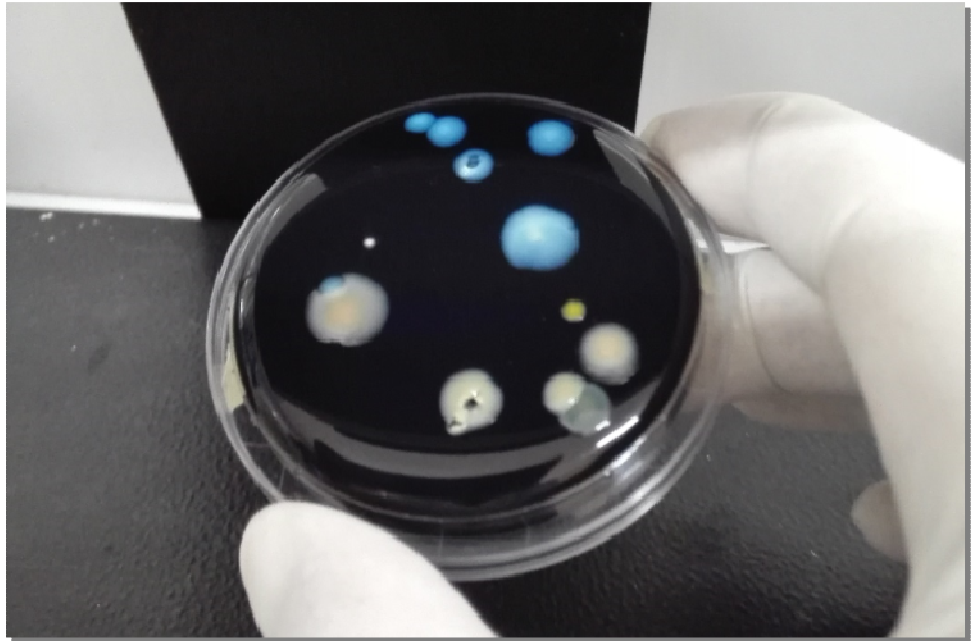
Figura 13 Piastra RODAC con GVPC, Legionelle (alto) e flora microbica di fondo

Il metodo colturale classico prevede due steps: l'isolamento e la conferma. Nel primo si cerca di minimizzare la carica microbica non di nostro interesse attraverso l'utilizzo di terreni selettivi e/o elettivi. In questo studio è stato utilizzato così come da ISO 11731-2:2004, agar

GVPC. Detto terreno in piastre Rodac è stato realizzato in laboratorio poiché non

esistono in commercio piastre Rodac già pronte (Figura 13 Piastra RODAC con GVPC, Legionelle (alto) e flora microbica di fondo); per la preparazione sono stati utilizzati i seguenti prodotti Thermo Fisher Scientific: Legionella CYE Agar base cod.CM0655, Legionella BCYE growth supplement with L-Cysteine cod.SR0110, Legionella GVPC selective supplement cod.SR0152. Il GVPC consente grazie ad un mix di antibiotici (Glycine (Ammonia free), Vancomycin hydrochloride, Polymyxin B sulphate, Cycloheximidedi), di eliminare i microorganismi indesiderati e far crescere solo la Legionella che manifesta resistenza all'azione battericida degli antibiotici aggiunti. Unitamente al trattamento antibiotico previsto nelle ISO 11731-2:2004 ed ISO 11731-1:1998, nonché nelle linee guida per la prevenzione del rischio legionellosi, viene specificato un trattamento acido ed uno al calore: essi non possono essere effettuati direttamente su agar per cui sono stati omessi. La risultante delle modifiche al metodo

porterebbe ad una crescita microbica di fondo più elevata, laddove nel campione vi siano microorganismi con resistenza agli antibiotici presenti nell'agar.



Dopo il campionamento si è

Figura 14 Legionella dumoffii (Fluoribacter dumoffii) illuminata con luce UV a 450nm

proceduto all'incubazione a 37°C in ambiente umido per 10 giorni, con controlli regolari ogni 3 giorni. Trascorso il periodo di incubazione, si è passati alla fase di conferma con le tecniche ufficiali che prevedono il test di utilizzo della cisteina: si piastra una coltura su BCYE-cys o nutrient agar (entrambi non contengono cisteina) e, se il batterio appartiene al genere Legionella, non vi sarà crescita poiché la cisteina è essenziale per il suo metabolismo. Altri tests di conferma prevedono l'utilizzo di anticorpi policlonali diretti verso specifici antigeni di Legionelle; laddove avviene un legame si forma un precipitato (agglutinazione) blu che ne segnala la positività.

In questo studio l'identificazione della Legionella dumoffii è stata facilitata grazie alla scelta del ceppo che appartenendo al gruppo dei batteri fluorescenti, si illumina se irradiato con luce UV a 450nm (Figura 14 Legionella dumoffii (Fluoribacter dumoffii) illuminata con luce UV a 450nm).

Tutte le condizioni sperimentali sono state verificate prima di essere inserite nel protocollo analitico, come la validazione del campionatore o le prove su piastre petri a distanza molto ravvicinata per tests di sedimentazione passiva. Nella stesura del protocollo sono state prese in considerazione molte variabili quali distanze e portate, concentrazioni dell'analita e metodi di campionamento; ciò comporta una notevole variabilità delle condizioni sperimentali e, per taluna di queste condizioni i risultati non sono numericamente significativi.

Attraverso i tests sulla doccia a circuito chiuso, su 42 campionamenti totali si è riscontrata positività alla Legionella spp in soli 2 casi, entrambi con una concentrazione di partenza di  $1,2 \times 10^4$  ufc/L, rispettivamente uno rilevato con SAS ad impatto su agar a 50cm e l'altro per sedimentazione passiva sempre a 50cm, in differenti momenti.

La filtrazione attraverso la membrana non ha prodotto risultati a noi utili, anche se solo tramite nebulizzatore vi è stata una debole crescita microbica interferente su GVPC, come avvenuto anche per gli altri metodi di campionamento utilizzati.

Ben diverso è stato l'esito del nebulizzatore ove, potendo monitorare tutte le variabili per la dispersione, si sono ottenuti dati numericamente validi. Il metodo di campionamento che ha prodotto dati migliori è stato il SAS ad impatto su agar; rispetto ai tests su doccia infatti, nel campionamento mediante sedimentazione passiva e filtrazione su membrana si è riscontrato un numero maggiore di positività, però ancora una volta poco significative; anche in questo caso i tests con membrana filtrante sono stati tutti negativi per la Legionella dumoffii.

Parallelamente alla determinazione della legionella, sono state indagate anche le cariche relative alla flora microbica di fondo (cresciuta su GVPC). Per ogni combinazione di variabili e metodi di campionamento sono stati effettuati 3 cicli di indagini, dai quali i dati più significativi vengono riportati e schematizzati nelle pagine a seguire.



Legionella								
Nebulizzatore p(1ml/1m35s)								
	3000 ufc/L		6000 ufc/L		9000 ufc/L		12000 ufc/L	
	50cm	100cm	50cm	100cm	50cm	100cm	50cm	100cm
<b>Ciclo 1</b>	1	0	2	1	9	4	12	5
<b>Ciclo 2</b>	0	0	3	5	7	5	8	7
<b>Ciclo 3</b>	0	0	3	2	6	3	8	6
<b>Ciclo 4</b>	0	0	4	1	5	4	12	7
<b>Ciclo 5</b>	0	0	3	2	8	3	10	7
<b>Ciclo 6</b>	1	0	3	0	8	4	9	6
<b>Ciclo 7</b>	0	0	1	2	6	4	10	8
<b>Ciclo 8</b>	1	0	3	3	7	5	11	9
<b>Ciclo 9</b>	0	0	4	1	7	2	9	6
<b>Somma</b>	3,0	0,0	26,0	17,0	63,0	34,0	89,0	61,0
<b>Media</b>	0,3	0,0	2,9	1,9	7,0	3,8	9,9	6,8
<b>Dev.Std</b>	0,5	0,0	0,9	1,5	1,2	1,0	1,5	1,2
<b>Recupero %</b>	5,6	0,0	24,1	15,7	38,9	21,0	41,2	28,2

Tabella 4 Unità formanti colonie recuperate su GVPC tramite nebulizzatore ad alta pressione; recupero calcolato su 2ml del campione alla concentrazione indicata.

Legionella								
Nebulizzatore p(1ml/3m10s)								
	3000 ufc/L		6000 ufc/L		9000 ufc/L		12000 ufc/L	
	50cm	100cm	50cm	100cm	50cm	100cm	50cm	100cm
<b>Ciclo 1</b>	0	0	2	1	5	4	9	4
<b>Ciclo 2</b>	0	0	0	1	6	2	7	5
<b>Ciclo 3</b>	0	0	3	0	6	5	7	7
<b>Ciclo 4</b>	0	0	3	0	3	3	10	4
<b>Ciclo 5</b>	0	0	1	2	6	4	9	4
<b>Ciclo 6</b>	0	0	4	1	6	1	8	6
<b>Ciclo 7</b>	0	0	2	2	6	3	6	5
<b>Ciclo 8</b>	0	0	3	0	5	4	7	4
<b>Ciclo 9</b>	0	0	1	0	6	5	9	5
<b>Somma</b>	0,0	0,0	19,0	7,0	49,0	31,0	72,0	44,0
<b>Media</b>	0,0	0,0	2,1	0,8	5,4	3,4	8,0	4,9
<b>Dev.Std</b>	0,0	0,0	1,3	0,8	1,0	1,3	1,3	1,1
<b>Recupero %</b>	0,0	0,0	35,2	13,0	60,5	38,3	66,7	40,7

Tabella 5 Unità formanti colonie recuperate su GVPC tramite nebulizzatore a bassa pressione; recupero calcolato su 1ml del campione alla concentrazione indicata

Flora microbica								
Nebulizzatore p(1ml/1m35s)								
	3000 ufc/L		6000 ufc/L		9000 ufc/L		12000 ufc/L	
	50cm	100cm	50cm	100cm	50cm	100cm	50cm	100cm
<b>Ciclo 1</b>	3	1	3	2	3	5	4	3
<b>Ciclo 2</b>	2	3	2	3	5	2	3	2
<b>Ciclo 3</b>	4	2	4	2	4	1	2	2
<b>Ciclo 4</b>	3	5	3	2	3	3	4	0
<b>Ciclo 5</b>	5	3	3	2	6	2	3	3
<b>Ciclo 6</b>	4	2	4	2	3	2	2	2
<b>Ciclo 7</b>	4	2	3	2	4	4	3	1
<b>Ciclo 8</b>	4	3	5	0	3	3	2	2
<b>Ciclo 9</b>	5	3	3	2	4	3	3	2
<b>Somma</b>	34,0	24,0	30,0	17,0	35,0	25,0	26,0	17,0
<b>Media</b>	3,8	2,7	3,3	1,9	3,9	2,8	2,9	1,9
<b>Dev.Std</b>	1,0	1,1	0,9	0,8	1,1	1,2	0,8	0,9
<b>Recupero %</b>	1,6	1,2	1,4	0,8	1,7	1,2	1,3	0,8

Tabella 6 Unità formanti colonie di carica mesofila di fondo recuperate su GVPC a 37°C tramite nebulizzatore ad alta pressione; recupero calcolato su 460 ufc/ml

Flora microbica								
Nebulizzatore p(1ml/3m10s)								
	3000 ufc/L		6000 ufc/L		9000 ufc/L		12000 ufc/L	
	50cm	100cm	50cm	100cm	50cm	100cm	50cm	100cm
<b>Ciclo 1</b>	4	0	2	1	2	1	1	1
<b>Ciclo 2</b>	2	1	3	2	3	4	2	1
<b>Ciclo 3</b>	2	0	3	0	4	2	2	0
<b>Ciclo 4</b>	3	1	3	0	5	1	1	0
<b>Ciclo 5</b>	3	0	2	2	4	2	3	1
<b>Ciclo 6</b>	4	1	1	1	3	0	3	0
<b>Ciclo 7</b>	2	0	2	1	5	3	2	0
<b>Ciclo 8</b>	3	1	1	0	1	1	3	1
<b>Ciclo 9</b>	1	0	2	1	4	4	1	0
<b>Somma</b>	24,0	4,0	19,0	8,0	31,0	18,0	18,0	4,0
<b>Media</b>	2,7	0,4	2,1	0,9	3,4	2,0	2,0	0,4
<b>Dev.Std</b>	1,0	0,5	0,8	0,8	1,3	1,4	0,9	0,5
<b>Recupero %</b>	1,2	0,2	0,9	0,4	1,5	0,9	0,9	0,2

Tabella 7 Unità formanti colonie di carica mesofila di fondo recuperate su GVPC a 37°C tramite nebulizzatore a bassa pressione; recupero calcolato su 230 ufc/ml

Il mancato recupero di *Legionella dumoffii* in alcune condizioni sperimentali è da attribuirsi a vari fattori. Nel caso del campionamento dalla doccia a circuito chiuso, la causa del mancato recupero non è da ascrivere ai metodi di campionamento, quanto all'effettiva capacità del soffione doccia di nebulizzare l'acqua. Il soffione utilizzato è di tipo "standard" con getto uniforme e gocce di media dimensione a caduta naturale, non estremamente pressurizzata: tali condizioni non hanno consentito una nebulizzazione efficace. Nel caso dell'aerosol generato tramite nebulizzatore si evince che il metodo più affidabile tra quelli testati nelle condizioni sperimentali descritte, è quello mediante SAS ad impatto su agar. Il recupero su supporto a membrana non ha dato esito alcuno, si suppone per l'alta sensibilità del batterio *Legionella dumoffii* alla disidratazione; la membrana infatti essendo idrosolubile ha potuto saturare tutta l'acqua nebulizzata non rendendola disponibile al microorganismo da essa veicolato. Si è comunque avuta una crescita batterica di fondo su membrane solubilizzate direttamente su GVPC e su PCA dopo essere state utilizzate per il campionamento, ed incubate in laboratorio rispettivamente a 37°C e 30°C.

Essendo stati sufficienti i dati relativi al recupero tramite SAS con impatto su agar e nebulizzazione "artificiale", si è potuto trattare i dati, riassumendoli graficamente a seguire, e discutendone i risultati più nello specifico (Rif. Tab. 4,5,6,7):

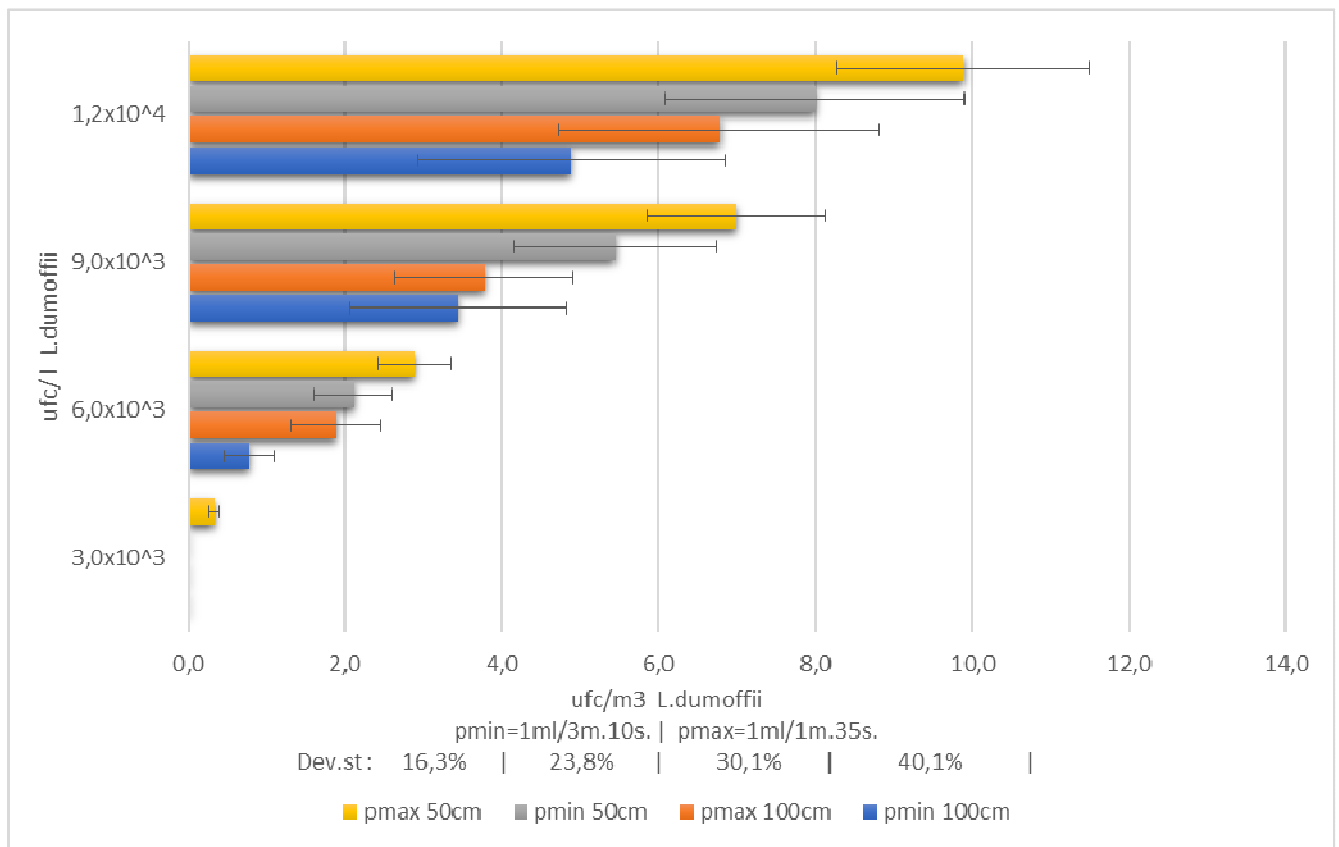


Grafico 1 media ufc/m3 L.dumffii nelle varie condizioni sperimentali

Nei vari steps di campionamento e nebulizzazione si è riscontrato un andamento crescente, coerente con le aspettative rispetto alla distanza, portata della nebulizzazione e concentrazione di partenza. Il (Grafico 1 media ufc/m3 L.dumffii nelle varie condizioni sperimentali) ha le ordinate disposte dalla combinazione pressione/carica iniziale meno probabile di recupero, sino a quella più probabile, ovvero alta carica batterica e portata dell'aerosol; si noti l'andamento crescente.

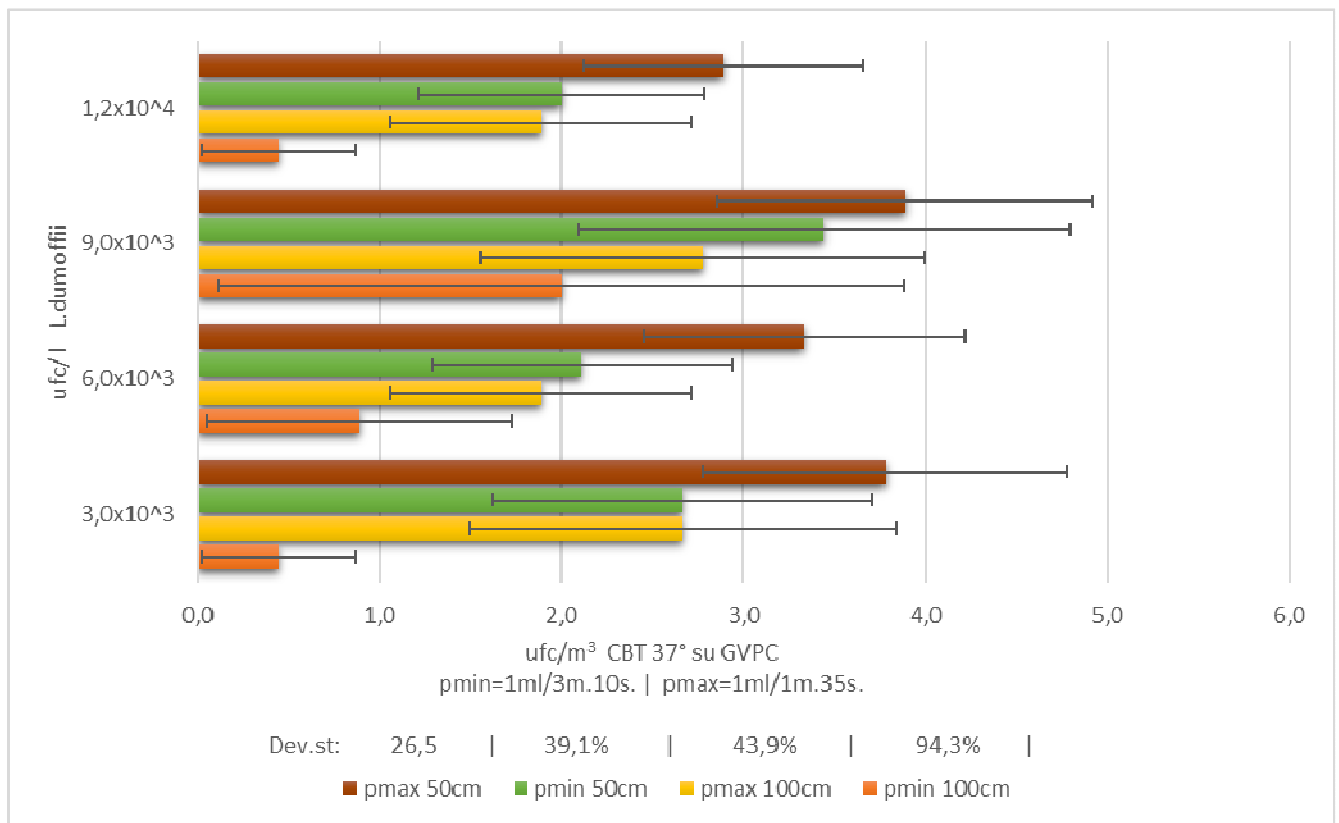
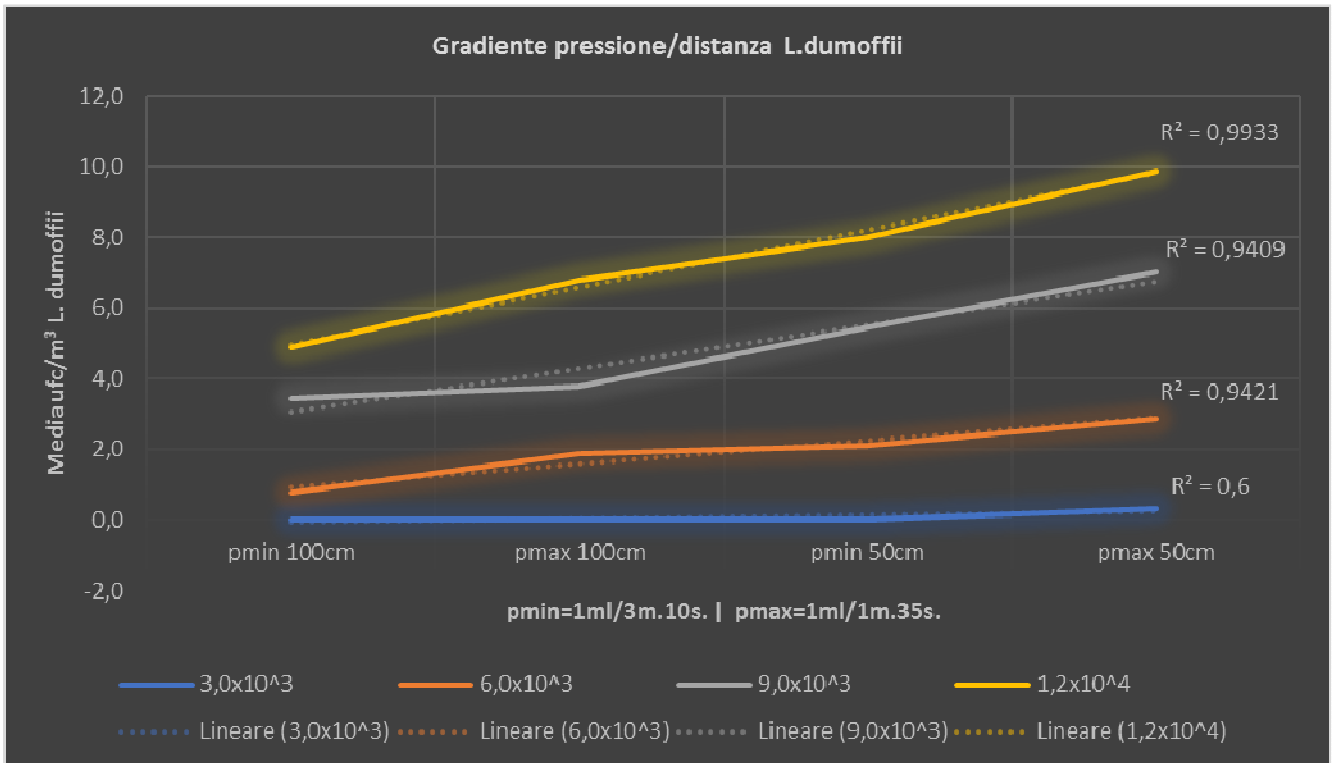


Grafico 2 media ufc/m<sup>3</sup> Flora microbica atipica, C1,C2,C3 Concentrazioni crescenti di legionella, pmin e pmax rappresentano le portate del nebulizzatore

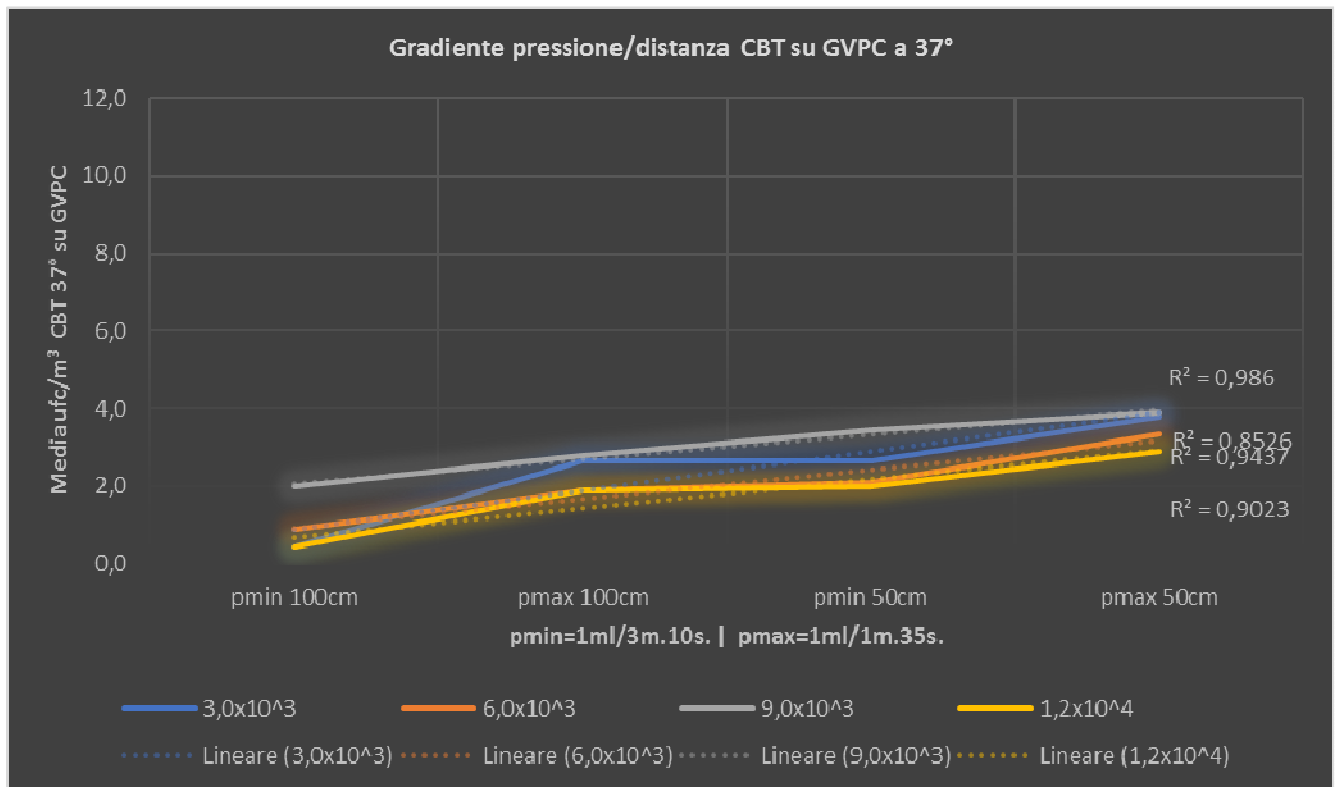
Per la carica batterica atipica a 37°C su GVP invece, non si è avuta alcuna correlazione poiché la carica nella soluzione di 30L di partenza si è sempre attestata sulle 230 ufc per ml di microorganismi a 37°C (UNI EN ISO 6222:2001) (Grafico 2 media ufc/m<sup>3</sup> Flora microbica atipica, C1,C2,C3 Concentrazioni crescenti di legionella, pmin e pmax rappresentano le portate del nebulizzatore). E' opportuno ricordare che, seppur non è stato isolato alcun microorganismo di L.dumoffii nel campionamento tramite filtrazione su membrana, si è avuto un riscontro positivo per quanto riguarda la carica batterica a 37°C incubata su PCA (UNI EN ISO 6222:2001).



**Grafico 3 Relazione tra portata/distanza, e recupero su agar**

Nel Grafico 3 si riportano, sulle ascisse i punti in cui si è avuto minore recupero, dunque a distanza di 100cm e portata bassa di nebulizzazione, sino all'estrema destra con distanza ravvicinata ed alta portata: si evince come al diminuire della distanza di campionamento (combinazione tra distanza fisica e pressione getto), aumenti la media di ufc/m<sup>3</sup> di legionella dumoffii recuperate; inoltre è evidente l'aumento del recupero proporzionale alle concentrazioni di campione nebulizzato, rappresentate dalle quattro diverse curve. I valori di R<sup>2</sup> aumentano all'aumentare della robustezza dei dati, ove a concentrazioni maggiori vi è maggior recupero.





**Grafico 4 media ufc/m3 flora atipica su GVPC a 37°C**

Simile risultato incrementale di recupero al diminuire della distanza si è avuto con la flora di fondo con nebulizzazione, anche se la correlazione tra le varie concentrazioni del campione è pressochè nulla, in quanto la carica della flora microbica atipica non è stata incrementata durante i tests; anche in questo caso i valori di R<sup>2</sup> aumentano all'aumentare del recupero, anche se si attestano su valori meno consistenti, in quanto la loro media riscontrata durante i tests è stata esigua (Grafico 4 media ufc/m<sup>3</sup> flora atipica su GVPC a 37°C). Tale dato è un indice di come il campionamento e la diffusione della legionella seguano gli "standards" dei microorganismi veicolati dall'aerosol.

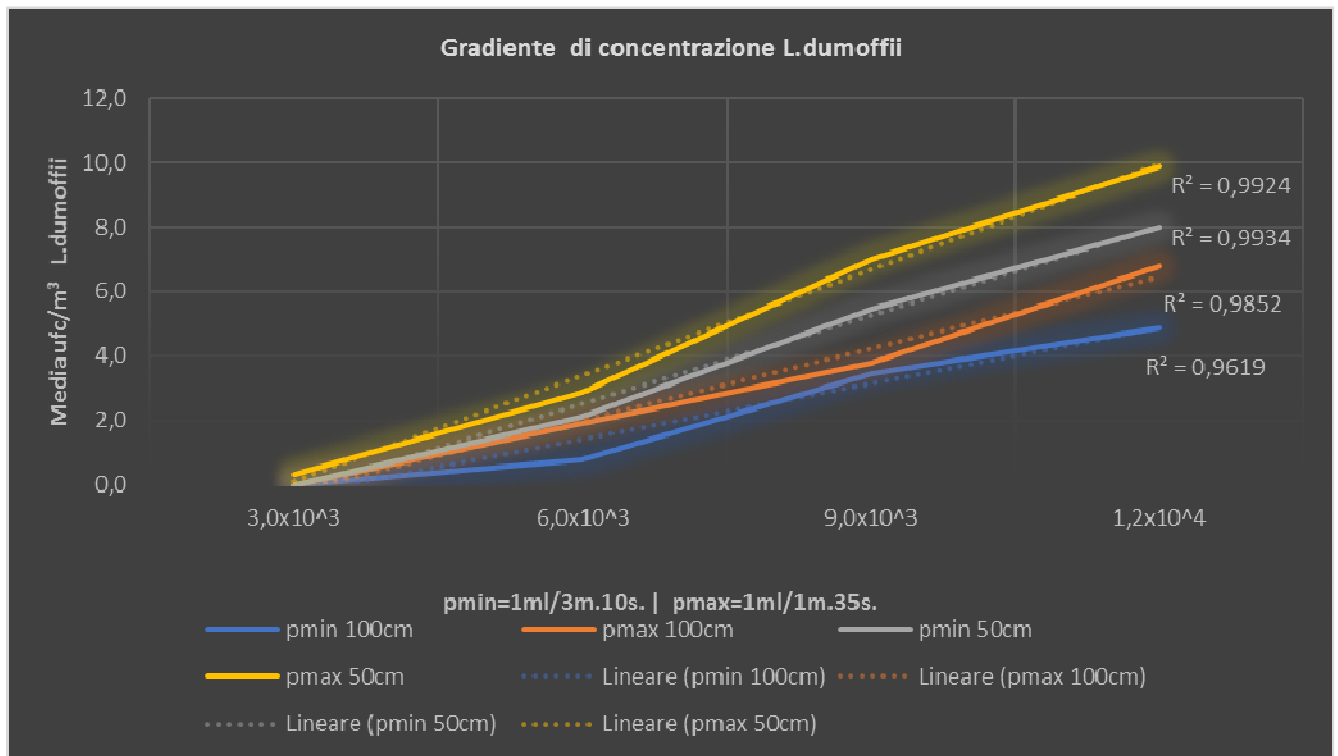


Grafico 5 Gradiente di concentrazione

Ponendo sull'asse delle ascisse il gradiente di concentrazione del campione, si nota come si verifici quanto già accennato in precedenza: il metodo di campionamento riesce ad avere un recupero incrementale attribuibile esclusivamente alla concentrazione della carica microbica. Le varie curve rappresentano le diverse combinazioni pressione/distanza. In questo caso i valori di R<sup>2</sup> sono più prossimi ad 1, ciò indica che vi è più correlazione tra i valori rappresentati per concentrazione che non per distanza, come visto in precedenza (Grafico 3); tuttavia vi è sempre correlazione tra pressione, distanza e concentrazione.

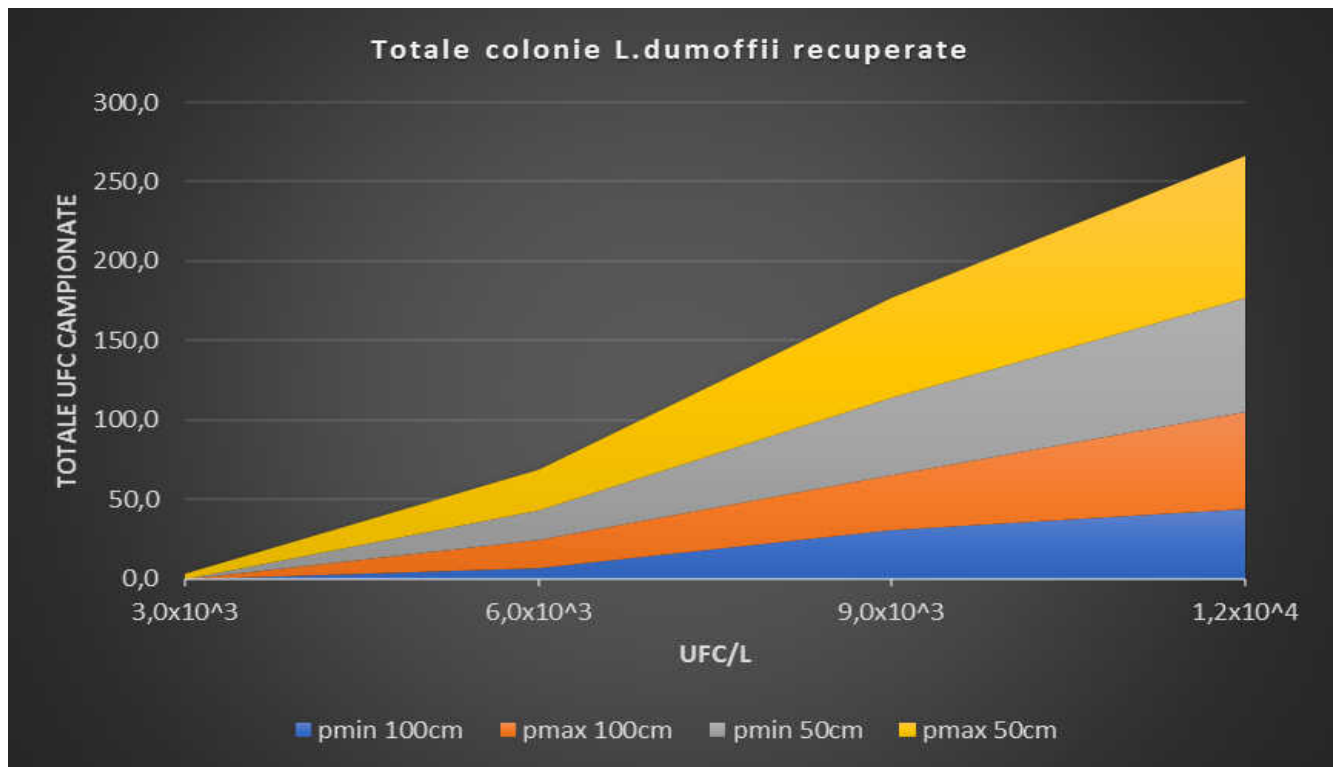
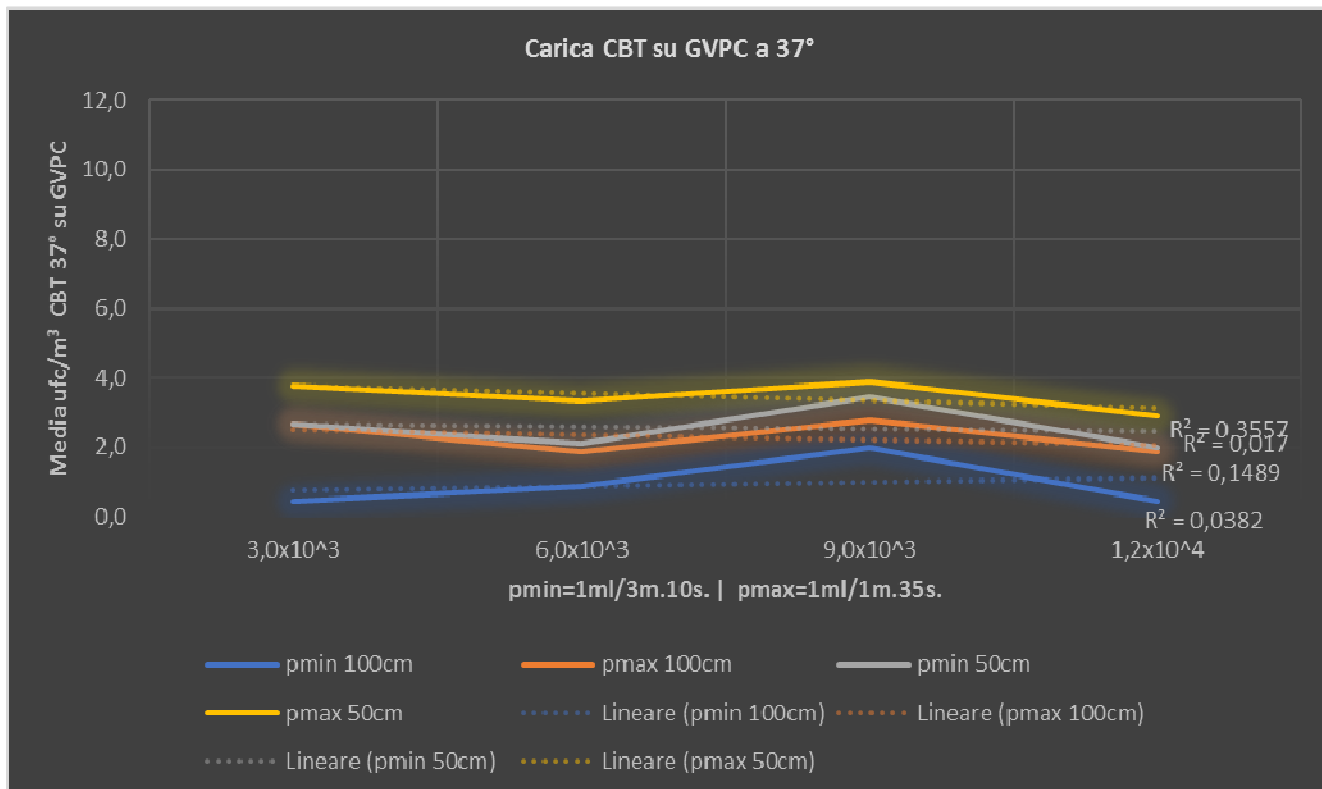


Grafico 6 Somma dei valori della media di ufc/m<sup>3</sup> recuperate, dalle varie concentrazioni di partenza

A supporto dei risultati sin ora ottenuti, la correlazione tra il recupero alle varie concentrazioni è graficamente rappresentata dalla somma di tutte le colonie recuperate ad ogni singola concentrazione. Dal Grafico 6 Somma dei valori della media di ufc/m<sup>3</sup> recuperate, dalle varie concentrazioni di partenza si evince come all'aumentare della concentrazione, aumenti il recupero delle ufc/m<sup>3</sup> di Legionella dumoffii, e dunque potenziali Legionelle spp. Tutte le colonie sono state confermate mediante osservazione con luce UV, crescita su Agar privo di cisteina e sporadicamente con sieri agglutinanti al lattice.



**Grafico 7** Variazione del recupero di colonie atipiche cresciute su GVPC a 37°C in 10 giorni

Le colonie atipiche recuperate sono state pressochè ininfluenti, grazie all'azione dei 4 antibiotici si è potuto limitare la crescita microbica interferente, che secondo i metodi standard andrebbe eliminata con trattamenti al calore e/o acidi. Si è avuto come detto in precedenza, un incremento del recupero al diminuire della distanza di campionamento ed all'aumentare della pressione del flusso nebulizzato (Grafico 7 Variazione del recupero di colonie atipiche cresciute su GVPC a 37°C in 10 giorni ; Grafico 8 Totale colonie atipiche recuperate su GVPC a 37°C per 10 giorni.).

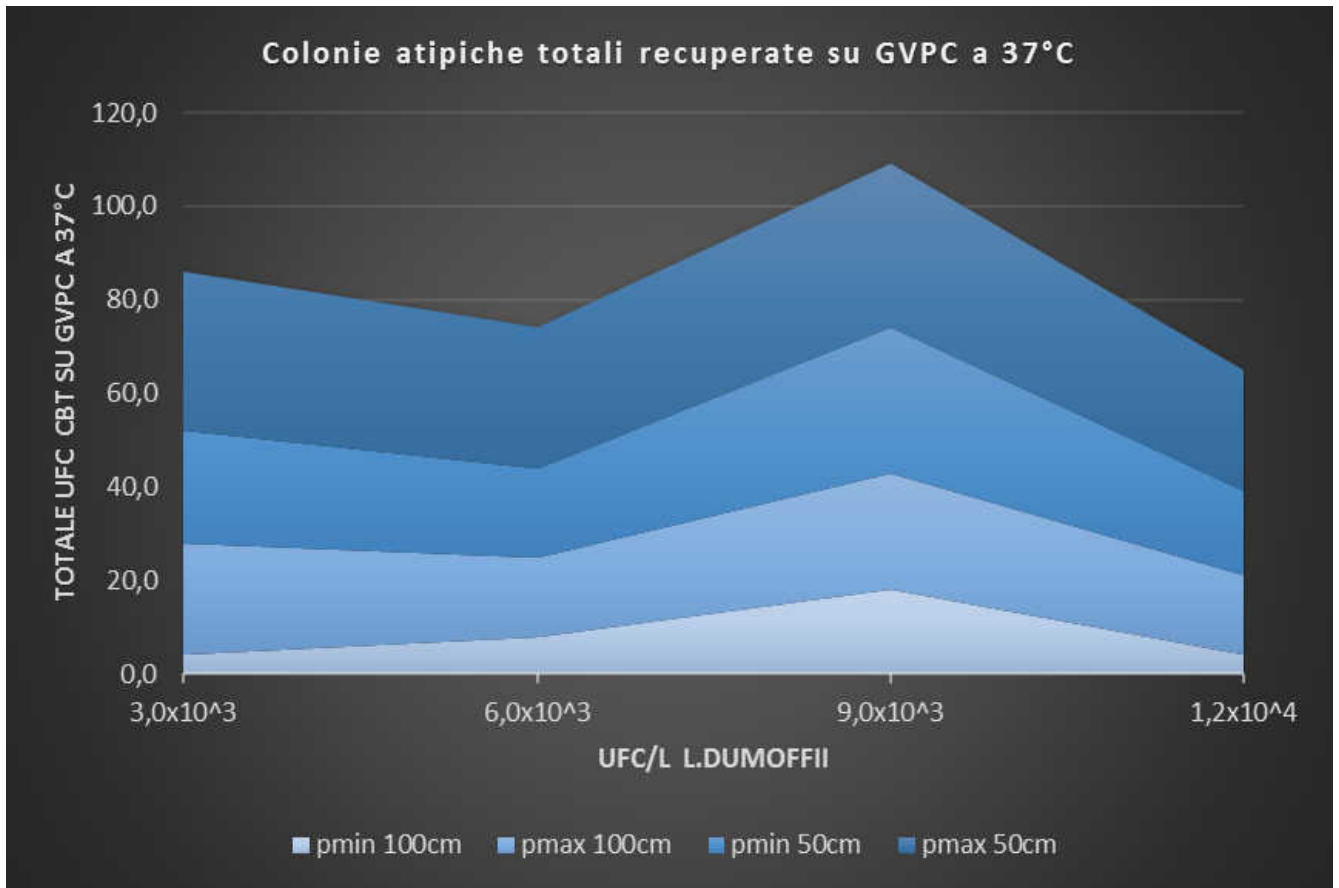


Grafico 8 Totale colonie atipiche recuperate su GVPC a 37°C per 10 giorni.

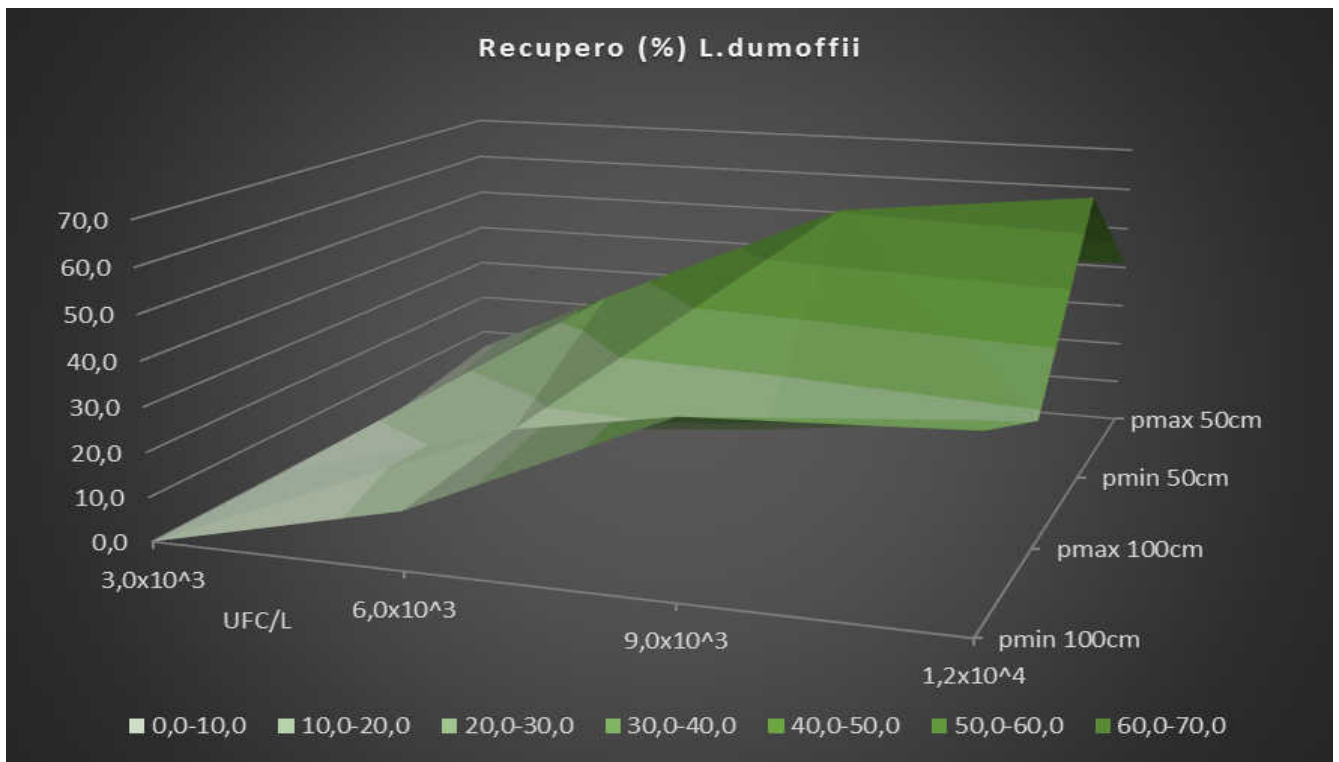


Grafico 9 Recupero di Legionella basato su pressione, distanza e concentrazione

Nonostante l'evidenza che solo ad alte concentrazioni si siano avuti valori di deviazione standard coerenti con i valori solitamente riscontrabili in microbiologia, è stato calcolato un recupero teorico dei microorganismi aerodispersi. Da considerare che veniva aspirato  $1\text{m}^3$  ogni 3min 10 sec mediante i SAS, ed a una portata del nebulizzatore di 1ml ogni 3min 10 sec il recupero massimo che in condizioni ottimali sarebbe di 1ml; considerando le varie concentrazioni vi è un'aspettativa di recupero dunque di 3,6,9 e 12 ufc/ml (oppure  $\text{m}^3$ ). Situazione diversa si è invece verificata per l'erogazione ad alta portata, dove in 3min e 10sec venivano nebulizzati 2 ml, pertanto sono stati considerati 6,12,18 e 24 ufc/ml come massimo recupero teorico.

Il recupero rappresentato nel (Grafico 9 Recupero di Legionella basato su pressione, distanza e concentrazione) è stato calcolato come sopra descritto, rispetto alla media delle ufc/ $\text{m}^3$

campionate ad ogni singola concentrazione, pressione (considerando 1 e 2 ml teoricamente recuperabili) e distanza; come da aspettative il miglior recupero si ha per l'avvicinamento alla fonte, all'aumento della portata e della concentrazione.

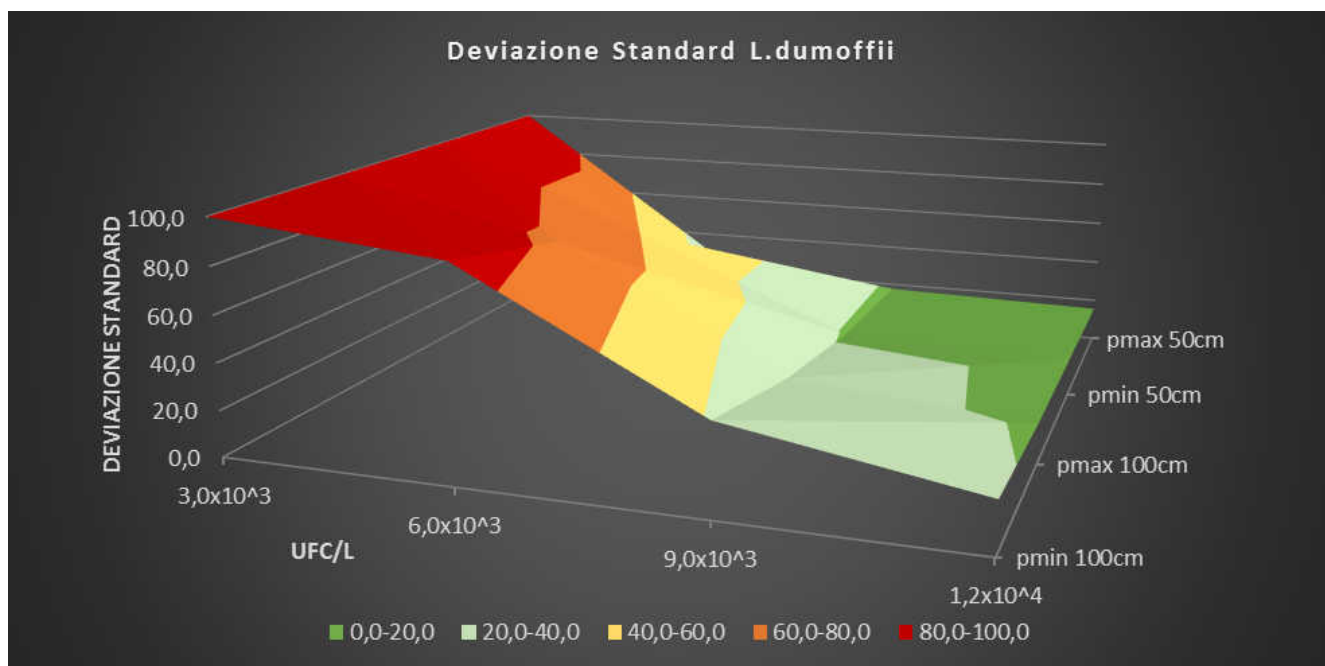


Grafico 10 Deviazione standard del recupero di Legionella dumoffii

Come prima anticipato, in microbiologia solitamente è accettabile una deviazione standard dei dati ottenuti che oscilla dal 15% al 20%; a causa anche della scarsità di dati numericamente significativi a basse concentrazioni, si è avuta un'alta deviazione standard. All'aumentare del recupero, complice anche la maggior robustezza dei dati, la deviazione standard ottenuta campionando a distanza ravvicinata dalla fonte, ad alte concentrazioni e pressioni elevate è scesa fino al 17,6% : ancora una volta al variare dei 3 fattori il campionatore risponde in maniera "adeguata e prevedibile" (Grafico 10 Deviazione standard del recupero di Legionella dumoffii).

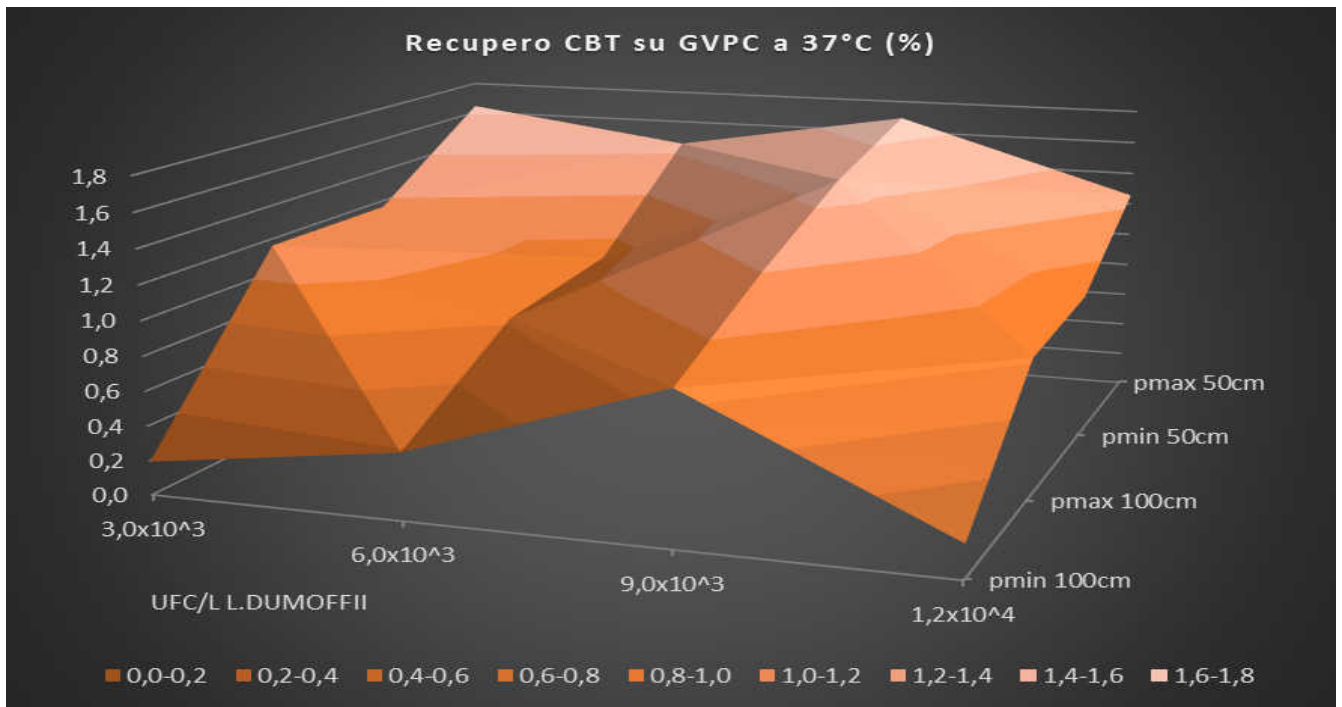


Grafico 11 Recupero flora microbica atipica su GVPC a 37°C

E' stato calcolato il recupero della flora microbica interferente cresciuta su GVPC a 37°C; a basse portate di nebulizzazione si considerano 230 ufc di microorganismi mesofili a 37°C per 1 ml teoricamente aspirato dal SAS, mentre ad alte portate si considerano 2 ml teoricamente recuperati, dunque 460 ufc. Pur avendo un esiguo recupero si nota l'andamento coerente con la distanza e la portata del nebulizzatore. Non si rilevano variazioni significative del recupero all'aumentare della concentrazione del campione, in quanto il titolo dei microorganismi atipici in esso contenuti oscilla da 200 a 260 ufc/ml (Grafico 11 Recupero flora microbica atipica su GVPC a 37°C);



Anche nel caso della flora microbica atipica, la deviazione standard diminuisce all'ottimizzazione del campionamento, non raggiungendo però il range ottimale 15-20% dei valori microbiologici. Probabilmente la causa è imputabile ad uno scarso recupero, e dunque ad una buona inibizione di crescita dell'agar utilizzato (Grafico 12 Deviazione standard del recupero di flora microbica atipica su GVPC).

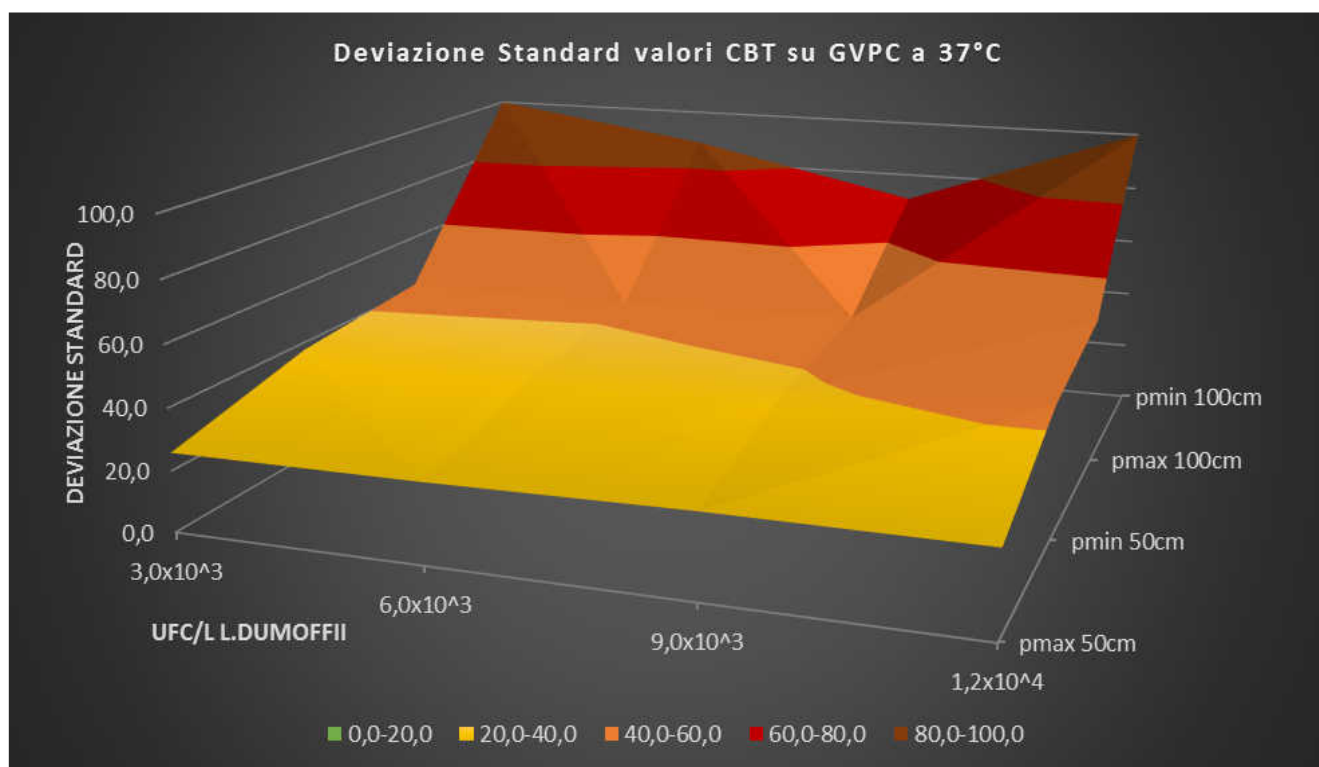


Grafico 12 Deviazione standard del recupero di flora microbica atipica su GVPC

Gli scarsi risultati ottenuti con la doccia a circuito chiuso con tutti i metodi di campionamento sperimentati, unitamente a quelli incoraggianti ottenuti mediante campionamento per impatto su agar mediante aspirazione con SAS ed aventi come fonte il nebulizzatore, sono un indice dell'importanza di una manutenzione costante a tutto l'impianto idrico: una doccia priva di incrostazioni ha una portata minore di nebulizzazione rispetto ad una incrostata di calcare (rappresentata dal nebulizzatore); pertanto anche la durezza dell'acqua ed il grado di utilizzo degli impianti sono sicuramente un indice di potenziale rischio di infezione poiché viene generato aerosol.

Nelle condizioni sperimentali descritte, il campionamento attivo mediante impatto su agar ha dato i risultati attesi, seppur a concentrazioni oltre i limiti soglia stabiliti dalle "Linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi".

In particolare si è evidenziato come il campionamento risponda agli effetti delle variazioni di portata del nebulizzatore, a quelli dati dalle variazioni di concentrazione del campione nebulizzato, ed al decremento del recupero all'aumentare della distanza. Seppur i risultati siano incoraggianti, il recupero calcolato si attesta intorno al 60% nelle migliori condizioni sperimentali simulate. Si ipotizza che tale valore rappresenti l'impossibilità di campionare interamente un ml nebulizzato in uno spazio ben più ampio di 1 m<sup>3</sup>: quest'ultimo infatti va incontro ad una diluizione nell'ambiente, ed un buon recupero si può ottenere solo laddove se ne limiti la diffusione, avvicinandosi appunto alla fonte.

In merito all'impossibilità di trattamento acido o termico del campione al fine di eliminare la flora microbica interferente, considerando che comunque esistono campionatori in commercio che sospendono l'aerosol in una soluzione salina rendendo possibili tali passaggi, il GVPC si è dimostrato un

valido supporto per l'elettività del microorganismo oggetto d'indagine, ed al contempo altrettanto selettivo da inibire la flora microbica atipica. Dai dati di recupero della flora microbica atipica osservati, si notano le evidenti proprietà battericide dell'Agar, evincibili da un recupero medio di solo l' 1,8% nei casi più eclatanti, rappresentati da una distanza ravvicinata ed un'alta portata di nebulizzazione.

In merito alle indicazioni relative all'impossibilità di campionamento di aerosol citate nelle linee guida, da questo studio preliminare si evince che vi è una correlazione tra la concentrazione della soluzione nebulizzata ed il recupero di colonie sull'agar, pertanto il metodo analitico si ritiene valido per la ricerca e, con riserva di ulteriori studi sulla percentuale di recupero del microorganismo target, per la quantificazione. Difatti una maggiore crescita di colonie di Legionella è stata sempre collegata ad una maggiore carica del campione, ed ad alte portate e distanze ravvicinate si è avuta una deviazione standard dei dati pari al 17,6%, coerente con i valori risultanti da indagini microbiologiche.

L'ostacolo maggiore dunque nella determinazione di Legionella spp. in aerosols non è da attribuire al metodo di campionamento o alla posizione dalla fonte come citato nelle Linee guida, bensì alla capacità della fonte di generare aerosols ed ovviamente alla carica del liquido nebulizzato: in base alla capacità di nebulizzazione della sorgente, ed alla presenza di biofilms o altre fonti di contaminazione "impianto-indipendenti" in esse contenute, si può avere una carica nebulizzata maggiore rispetto a quella riscontrata nell'acqua dell'impianto; pertanto seppur difficilmente riscontrabile in campioni reali di bioaerosol, un buon protocollo di prevenzione consisterebbe nel verificare l'effettivo rischio di nebulizzazione presente all'interno di un sito sottoposto a sorveglianza, magari attraverso un tracciante innocuo ma al tempo stesso aerofilo e con le stesse caratteristiche della legionella, al fine di valutarne il rischio infezione.

## INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1 - Fattori di rischio e malattie di base che favoriscono il contagio da Legionella spp.....	24
Tabella 2 Principali modalità di trasmissione della Legionella spp. ....	26
Tabella 3 Manifestazioni extrapolmonari della legionellosi.....	32
Tabella 4 Unità formanti colonie recuperate su GVPC tramite nebulizzatore ad alta pressione; recupero calcolato su 2ml del campione alla concentrazione indicata. ....	49
Tabella 5 Unità formanti colonie recuperate su GVPC tramite nebulizzatore a bassa pressione;.....	50
Tabella 6 Unità formanti colonie di carica mesofila di fondo recuperate su GVPC a 37°C tramite .....	51
Tabella 7 Unità formanti colonie di carica mesofila di fondo recuperate su GVPC a 37°C tramite .....	52

## INDICE DELE FIGURE

Figura 1 Legionella pneumophila al S.E.M. ....	8
Figura 2 Formazione di biofilms su superfici.....	13
Figura 3 Legionella dumoffii isolata da un campione d'acqua, esposta a luce UV a 450nm.....	35
Figura 4 Funzionamento nebulizzatore.....	37
Figura 5 Nebulizzatore da laboratorio.....	37
Figura 6 Doccia a circuito chiuso .....	39
Figura 8 Campionatore SAS 90 .....	40
Figura 7 Campionatori utilizzati.....	40
Figura 9 SAS per piastre RODAC.....	42
Figura 10 SAS Membrana e impatto .....	42
Figura 11 SAS modificato per membrana.....	43
Figura 12 Piastra petri utilizzata per tests di sedimentazione esplorativi.....	44
Figura 13 Piastra RODAC con GVPC, Legionelle (alto) e flora microbica di fondo .....	45
Figura 14 Legionella dumoffii (Fluoribacter dumoffii) illuminata con luce UV a 450nm .....	46

## INDICE DEI GRAFICI

Grafico 1 media ufc/m3 <i>L.dumiffii</i> nelle varie condizioni sperimentali .....	54
Grafico 2 media ufc/m3 Flora microbica atipica, C1,C2,C3 Concentrazioni crescenti di legionella,.....	55
Grafico 3 Relazione tra portata/distanza, e recupero su agar .....	56
Grafico 4 media ufc/m3 flora atipica su GVPC a 37°C.....	57
Grafico 5 Gradiente di concentrazione .....	58
Grafico 6 Somma dei valori della media di ufc/m3 recuperate, dalle varie concentrazioni di partenza .....	59
Grafico 7 Variazione del recupero di colonie atipiche cresciute su GVPC a 37°C in 10 giorni .....	60
Grafico 8 Totale colonie atipiche recuperate su GVPC a 37°C per 10 giorni.....	61
Grafico 9 Recupero di Legionella basato su pressione, distanza e concentrazione.....	62
Grafico 10 Deviazione standard del recupero di Legionella <i>dumoffii</i> .....	63
Grafico 11 Recupero flora microbica atipica su GVPC a 37°C .....	64
Grafico 12 Deviazione standard del recupero di flora microbica atipica su GVPC.....	65

## BIBLIOGRAFIA

- Diederens BMW. Legionella spp and Legionnaires' disease. J Infect 2008;56(1):1–12
- Yu VL et al. Distribution of Legionella species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. J Infect Dis 2002;186(1):127-128.
- A.I.I.S.A. Associazione Italiana Igienisti Sistemi Aerulici – [www.aiisa.it]
- *British standard BS 7592, 1992 - Methods for sampling for Legionella organism in water and related materials. BSI, London.*
- *Brundrett G.W., 1992 - Epidemics from cooling towers and industrial processes. Outbreak at Stafford District General Hospital. Cases from clean water supplies such as domestic water services and space. In: Legionella and*
- *Building Services. Brundrett G. W. Ed., Butterworth-Heinemann Ltd. Oxford.*
- *Castellani Pastoris M., Benedetti P., 1993 - Legionella e Legionellosi. ISS e Assessorato alla Sanità Regione Campania. ed. Mark it, Roma.*
- *Castellani Pastoris M., Ciceroni L., Lomonaco R. et al Molecular epidemiology of an outbreak of Legionnaires' disease associated with cooling tower in Genova – Sestri Ponente Italy. Europe J Clin Microbiol Infect Dis 16: 883/92, 1997*
- *CDC Guidelines for Prevention of Nosocomial Pneumonia MMWR Jan 03,1997 / 46(RR-1); 1-79*

- Circolare DGS n.97/311 del 24 aprile 1997 della Direction Générale de la Santé République Française.
- *Colbourne J.S., Dennis P. J. L., 1988 - Legionella: a biofilm organism in engineered water system. Barking Elsevier, Biodeterioration, 7: 36-42.*
- Draft for development DD 211, 1992 - Culture method for the isolation of *Legionella* organisms and estimation of their number in water and related materials. BSI, London.
- *Guglielmini A., Caruso E., De Cicco A. L. e Sebastiani Annichiarico L., 1992 – Diffusione ambientale delle Legionellae e dei casi di legionellosi. Annali Igiene, 4: 89-98.*
- *Hurst C. J., 1997 - Manual of environmental microbiology. ASM, Washington, D.C.*
- *Kusnetov J. M., Jousimies Somer H. R., Nevalainen A. I. e Martikainen P. J., 1994 - Isolation of Legionella from water samples using various culture methods. Journal of Applied Bacteriology, 76: 155-162.*
- *Le Minor L., Veron M., 1989 - Bacteriologie médicale. Medicine – Sciences. Flammarion, 2<sup>a</sup> ed., Paris.*
- *Muresu E., Mura I., Castiglia P. e Palmieri A., 1993 - Monitoraggio e controllo di microrganismi emergenti; le legionelle in ambiente ospedaliero. Igiene Moderna, 100: 1261-1272.*
- *Murray P. R., Baron E. J., Pfaller M. A., Tenover F. C. e Tenover R. H., 1999 - Manual of Clinical Microbiology. 7<sup>th</sup> ed. ASM, Washington, D.C.*



- *Passi C., Maddaluno R. e Castellani Pastoris M., 1990 - Incidence of Legionella pneumophila infection in tourists: Italy. Public Health, 104: 183-188.*
- *Stout J.E., Yu V.L. e Best M. G., 1985 - Ecology of Legionella pneumophila within water distribution systems. Applied and Environmental Microbiology, 49, 1: 221-228.*
- *Ta A. C., Stout J. E., Yu V. I. e Wagener M. M., 1995 - Comparison of culture methods for monitoring Legionella species in Hospital potable water system and recommendation for standardization of such methods. Journal of Clinical Microbiology, 33: 2118-2123.*
- *Tison D.L., Pope D. H., Cherry W. B. e Fliermans C. B., 1980 - Growth of Legionella pneumophila in association with blue green algae (Cyanobacteria). Applied and Environmental Microbiology, 39, 2: 456-459.*
- *Volterra L., 1995 - La presenza e il significato di Legionella nell'ambiente e nelle acque potabili. Metodi di rilevamento acque potabili: i problemi microbiologici emergenti. Parte II, Pitagora ed., Bologna.*
- *WHO Emerging and other Communicable Diseases, Surveillance and Control WHO/EMC/DIS/97.1 Ottobre 1997*
- *Yu VL Legionella pneumophila (Legionnaires' Disease) p2087 – 2097 in: Mandell GL., Bennet JE., Dolin R. (ed) Principles and Practice of Infectious Diseases 4<sup>th</sup> edition Churchill Liv. NY 1995*