



# UNIVERSITÀ DI PISA

**DIPARTIMENTO DI RICERCA TRASLAZIONALE E  
DELLE NUOVE TECNOLOGIE IN MEDICINA E CHIRURGIA**

**CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN MEDICINA E  
CHIRURGIA**

*Tesi di Laurea*

*“La validazione di procedure per il contenimento del rischio idrico in un  
ospedale di rilievo nazionale”*

**RELATORE:**

Prof. Angelo Baggiani

**CANDIDATO:**

Maria Giulia Bianchi

ANNO ACCADEMICO: 2012-2013

## INDICE

<b>RIASSUNTO .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPITIOLO 1 - INTRODUZIONE .....</b>	<b>3</b>
1.1 ASPETTI GENERALI .....	3
1.2 LA LEGIONELLA .....	9
1.2.1 Caratteristiche microbiologiche.....	12
1.2.2 Condizioni ideali per lo sviluppo di <i>Legionella pneumophila</i> ..	15
1.2.3 Modalità di trasmissione e patogenesi.....	16
1.2.4 Fattori di rischio.....	18
1.2.5 Clinica.....	20
1.2.6 Diagnosi di laboratorio in campioni clinici e ambientali .....	23
1.2.7 Terapia .....	34
1.2.8 Aspetti Epidemiologici .....	36
<b>CAPITOLO 2 - INDAGINE EPIDEMIOLOGICA E SORVEGLIANZA DELLA LEGIONELLOSI.....</b>	<b>46</b>
2.1 INDAGINE EPIDEMIOLOGICA.....	46
2.2 SORVEGLIANZA DELLA LEGIONELLOSI.....	48
2.2.1 Sorveglianza internazionale della legionellosi nei viaggiatori. .	51
<b>CAPITOLO 3 - LINEE-GUIDA, RACCOMANDAZIONI E MISURE DI CONTROLLO PER CONTENERE IL RISCHIO DI LEGIONELLA ...</b>	<b>53</b>
3.1 LINEE-GUIDA NEI PAESI EUROPEI E NEL MONDO. ....	53
3.1 METODI DI PREVENZIONE E CONTROLLO DELLA CONTAMINAZIONE DEL SISTEMA IDRICO. ....	58

<b>CAPITOLO 4 - SOTTOPRODOTTI DELLA DISINFEZIONE ED EFFETTI SULLA SALUTE .....</b>	<b>72</b>
<b>CAPITOLO 5 - RISCHIO LEGIONELLOSI ASSOCIATO AD ATTIVITA PROFESSIONALE.....</b>	<b>87</b>
<b>CAPITOLO 6 - LEGIONELLA E LA SINDROME DA EDIFICIO MALATO .....</b>	<b>92</b>
<b>CAPITOLO 7 - SCOPO.....</b>	<b>97</b>
<b>CAPITIOLO 8 - MATERIALI E METODI .....</b>	<b>98</b>
8.1 PUNTI DI PRELIEVO E MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO .....	98
8.1 ANALISI DEI CAMPIONI ED ISOLAMENTO DI <i>LEGIONELLA</i> SPP	
101	
<b>CAPITOLO 9 - RISULTATI E DISCUSSIONI .....</b>	<b>102</b>
<b>CAPITOLO 10 - CONCLUSIONI .....</b>	<b>115</b>
<b>CAPITOLO 11- BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>120</b>
<b>CAPITOLO 12 - SITOGRAFIA .....</b>	<b>130</b>
<b>RINGRAZIAMENTI .....</b>	<b>131</b>

## **Riassunto**

Lo studio e la gestione delle problematiche relative alla qualità dell'acqua nelle strutture sanitarie è divenuto oggi un tema di grande interesse da parte degli organi sanitari responsabili, in quanto una contaminazione dell'acqua destinata al consumo umano rappresenta un pericolo sanitario serio ed un potenziale evento avverso per il paziente che presenta fattori di rischio quali malattie croniche debilitanti e immunodepressione.

Una rete idrica non protetta da eventuali contaminazioni di natura microbiologica, sia perché non sottoposta ad interventi di disinfezione e manutenzione, sia per le sue caratteristiche strutturali intrinseche, può determinare l'erogazione di un'acqua che manca dei requisiti di qualità e come tale diviene vettore di infezione.

L'associazione tra la presenza di *Legionella* spp. nell'acqua potabile e nell'acqua calda degli ospedali e Malattia dei legionari, infatti, è un noto esempio di infezione nosocomiale.

A tal proposito il problema della legionellosi sta suscitando sempre più vivo interesse non solo tra gli addetti ai lavori ma anche tra la popolazione e in particolare in seguito alla segnalazione di casi isolati o di cluster nosocomiali e comunitari. Con questa tesi si cerca di valutare le diverse strategie impiegate per la disinfezione dell'acqua sanitaria e in particolare viene verificata la validità delle diverse procedure per il contenimento e gestione del rischio idrico adottate in un ospedale di rilievo nazionale.

L'Azienda Ospedaliera in esame ha messo in atto una strategia per la prevenzione e il controllo della legionellosi, basata sulla stesura di un programma di sorveglianza ambientale. Nel corso di tale programma è emersa più volte la necessità di effettuare interventi di bonifica.

In un'ottica di miglioramento continuo si è effettuato uno studio della durata di 5 anni intrapreso a partire dal gennaio 2008 che prevede la valutazione dell'efficacia dei sistemi di bonifica per il controllo della

contaminazione da *Legionella pneumophila*. Nel corso di questi anni pertanto sono state applicate e valutate nel tempo diverse tipologie di interventi di disinfezione.

Dall'analisi dei dati relativi all'indagine effettuate sull'acqua calda sanitaria si nota un particolare andamento altalenante nel tempo del numero di campioni positivi alla *Legionella pneumophila* nonché della carica microbica media. Non è stato semplice associare i diversi dati agli effetti degli interventi di bonifica dato che il batterio è ubiquitario, è in grado di colonizzare il biofilm, e replicarsi all'interno di amebe. La difficoltà della valutazione dei risultati sicuramente è anche dovuta alla non precisa conoscenza della rete idrica.

La concentrazione di *L.pneumophila* si riduce sempre dopo un intervento di bonifica ma poi con il tempo tende nuovamente ad aumentare. Come indicato in letteratura i metodi di disinfezione per il controllo della diffusione e moltiplicazione del batterio negli impianti sono tutti efficaci nel breve periodo ma non altrettanto a lungo termine.

La sorveglianza ambientale della *Legionella* spp. quindi, resta una delle strategie di prevenzione e controllo del rischio di legionellosi più efficaci.

Essa consente infatti di monitorare nel tempo i livelli di contaminazione e di applicare di volta in volta gli interventi di bonifica più appropriati.

# Cap.1 - INTRODUZIONE

## 1.1 Aspetti Generali

La qualità dell'acqua è un tema attuale e scottante come quello della sua disponibilità e ha un legame diretto con la salute dell'uomo.

La consapevolezza dell'importanza delle caratteristiche di qualità dell'acqua si è affermata con il sapere scientifico e il concetto si è evoluto attraverso lo sviluppo di principi di valutazione dei rischi correlati alla presenza di sostanze naturali od originate da contaminazione antropica.

L'acqua è una risorsa fondamentale per la vita: infatti, oltre ad essere la principale componente in peso (dal 40% al 98%) della materia vivente, costituisce il mezzo in cui si svolgono la maggioranza dei processi biochimici. L'uomo per esempio è composto circa per il 70% del peso corporeo (64% adulti e 71% neonati) da acqua. Il tessuto in cui l'acqua è più abbondante è il cervello (80%) seguito dal sangue (80%), dai muscoli (74%), dalla cute (70%), dal tessuto connettivo (60%) e dalle ossa (30%).

L'acqua è il motore che fa funzionare i processi metabolici dell'organismo, tessuti a maggior attività metabolica, quindi, sono più ricchi di acqua. L'acqua introdotta con gli alimenti e le bevande è un nutriente essenziale per l'uomo poiché la quantità di acqua prodotta con il metabolismo non è sufficiente a coprire il fabbisogno giornaliero. Essa è coinvolta in una serie di funzioni fondamentali per la nostra vita: permette il trasporto di nutrienti, regola il bilancio energetico, ha potere detossificante, regola la temperatura corporea e l'equilibrio idrico. Utilizzata come bevanda favorisce i processi digestivi, è fonte di sali minerali e svolge un ruolo fondamentale come diluente delle sostanze ingerite oralmente inclusi i medicinali.

L'acqua costituisce una risorsa fondamentale per l'uomo a causa dei suoi molteplici usi, essendo destinata ai fabbisogni primari (potabile, civile, agricolo, etc.), ed alla produzione di beni (uso industriale, agricolo, navale, produzione di energia, etc.) La sua presenza ha influenzato la nascita e la diffusione della civiltà: non a caso, tanti grandi insediamenti urbani nel mondo sono situati nelle vicinanze di fiumi, laghi, mari.

La superficie terrestre è circa nel 25% costituita da terre emerse e per il restante 75% dalle acque degli oceani. Il 97% delle acque presenti sul pianeta è salata e solo il 3% è dolce, se si considera poi che per i due terzi questa è ghiacciata, ci si rende conto che di tutta l'acqua presente sulla terra se ne può disporre soltanto del 1%. Il fabbisogno minimo biologico pro-capite per la sopravvivenza umana è di 5 litri d'acqua, si può sopravvivere un mese senza cibo ma solo una settimana senza acqua.

Per poter parlare di condizioni accettabili di vita occorrono non meno di 50 litri di acqua al giorno per ogni essere umano nelle 24 ore. L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) afferma che al di sotto della soglia di 50 litri si può parlare di sofferenza per mancanza d'acqua e che il 40% della razza umana vive in condizioni igieniche impossibili soprattutto per carenza di acqua. Il problema dell'accesso, distribuzione e uso di acqua qualitativamente accettabile è ampiamente e drammaticamente presente soprattutto come rischio infettivo nei paesi in via di sviluppo. Ancora oggi più di 1,5 miliardi di persone non ha accesso alla acqua e 2,6 miliardi non hanno a disposizione installazioni sanitarie adeguate con la conseguenza che ogni anno circa 5-10 milioni di individui muoiono per cause idrosanitarie e 30 milioni per effetti direttamente riconducibili alla scarsità dell'acqua. Per la maggioranza delle popolazioni povere del mondo una delle più gravi minacce è rappresentata dall'utilizzo di acqua non rispondente a caratteristiche di buona qualità. Secondo l'OMS, l'80% delle malattie rilevate è da attribuire ad acqua insalubre e ad insufficienti

condizioni igieniche. È noto che il rischio più facilmente associabile all'uso di acqua potabile contaminata viene principalmente e tradizionalmente correlato alla contaminazione da parte di microrganismi patogeni di origine enterica (*Salmonella* spp., *Vibrio colera*, *Shigella* spp.) che possono raggiungere le falde acquifere e più facilmente contaminare le acque superficiali, che dopo una successione di trattamenti possono essere utilizzate come acque per il consumo umano. Il rischio infettivo, legato quindi alla presenza nella acqua di microrganismi patogeni che causano malattie di natura enterica, è ancora molto elevato nei Paesi meno sviluppati.

Nei Paesi industrializzati, invece, negli ultimi decenni è stato registrato in generale, un parziale declino delle patologie legate alla diffusione dei più tradizionali patogeni enterici, presumibilmente legato, soprattutto, alla messa in opera di processi di trattamento e disinfezione delle acque, alla attività di controllo della loro qualità igienico sanitaria, così come definite dalla normative e alle campagne di vaccinazione. Tuttavia, è noto che, nonostante i processi di potabilizzazione, è possibile rilevare una presenza costante di flora microbica, selezionata dopo il trattamento, in cui si ritrovano microrganismi caratterizzati da una maggiore capacità di sopravvivenza. Pertanto, se è pur vero che l'acqua potabilizzata è microbiologicamente diversa da quella grezza, e ragionevolmente esente da patogeni, essa, tuttavia, risulta veicolo di numerosi microrganismi (*waterborne pathogens*). Inoltre, è emerso che, a causa del processo di potabilizzazione delle acque, è riscontrabile in queste la presenza di sottoprodotti legati alle varie fasi del trattamento e in particolare al processo di disinfezione (*disinfectant by products*).

La gestione della risorsa idrica, quindi, è un aspetto fondamentale della prevenzione e rappresenta il primo obiettivo che la sanità pubblica si pone soprattutto in relazione alle caratteristiche di qualità microbiologica e



chimica. Per tale motivo, nei diversi Paesi sono stati emanati numerosi provvedimenti legislativi atti a definire i parametri di qualità dell'acqua destinata al consumo umano. In Italia, secondo il D.Lgs. 31/2001, possono essere definite come acque destinate al consumo umano: *“Le acque, trattate o non trattate, destinate ad uso potabile, alla preparazione di cibi e bevande, o ad altri usi domestici, a prescindere dalla loro origine, siano esse fornite tramite una rete di distribuzione, mediante cisterne, in bottiglie o in contenitori.”* Lo stesso decreto disciplina la qualità delle acque destinate al consumo umano, al fine di proteggere la salute dagli effetti negativi derivanti dalla contaminazione delle acque imponendo che esse siano salubri, pulite, non contaminate da microrganismi, parassiti e da sostanze in concentrazioni sufficientemente alte da rappresentare un pericolo per la salute. Lo scopo della gestione delle acque destinate al consumo umano è quello di agire in modo da rendere più bassa possibile la probabilità di contaminazione, attraverso interventi volti a ridurre il rischio chimico e biologico.

Tuttavia, si è compreso che esistono situazioni di particolare criticità nelle quali è opportuno che la qualità dell'acqua erogata sia particolarmente elevata e dovrebbero essere valutati anche parametri aggiuntivi. L'ospedale, in particolare, costituisce un ambiente alquanto critico, sia per la coesistenza di tipologie architettoniche, funzionali e operative molto diverse tra loro che per le caratteristiche degli occupanti. Chi soggiorna in questi ambienti, infatti, è una popolazione particolare, affetta da problemi di salute e talora con ridotte difese immunitarie, più suscettibile rispetto alla popolazione generale verso fattori di rischio ambientale. In particolare, l'acqua rappresenta tuttora il veicolo di infezione in numerose patologie nosocomiali, anche se il suo ruolo è stato per lungo tempo sottostimato. Le modalità di controllo del sistema idrico comprendono mezzi di disinfezione chimici e fisici che, per quanto potenzialmente efficaci come

interventi puntuali, spesso non garantiscono un effetto duraturo nel tempo. Inoltre, gli interventi di bonifica spesso sono influenzati dalla complessità e dallo stato di usura della rete di distribuzione (presenza di rami “morti”, incrostazioni calcaree e biofilm). Sicuramente il trattamento di bonifica più utilizzato prevede l’impiego di composti a base di cloro che, se da un lato garantiscono una buona efficacia nei confronti della flora microbica, dall’altro evidenziano limiti (in particolare negli articolati circuiti idrici ospedalieri) per la difficoltà nel mantenimento di un ottimale tenore di cloro residuo libero nella intera rete di distribuzione, condizione che incrementa il rischio di acquisizione delle infezioni nei reparti di degenza degli immunodepressi.

In ambiente sanitario sono molteplici le tipologie di acque erogate che possono talora diventare veicolo di patogeni: vi sono acque potabili, dunque acqua fredda non trattata destinata ad usi igienici ed alimentari; acque trattate, che devono avere particolari requisiti, diversi a seconda delle loro finalità d’uso (ad esempio l’acqua calda sanitaria, l’acqua per l’ emodialisi, etc.). Vi sono poi le acque dell’impianto di umidificazione, acque per l’impianto antincendio e le acque industriali.

All’interno della moltitudine di patogeni trasmessi attraverso l’acqua risultano di particolare interesse, per quanto riguarda le infezioni nosocomiali, batteri quali *Pseudomonas aeruginosa* (che si stima causi da solo circa 1400 decessi/anno negli Stati Uniti per polmonite nosocomiale contratta mediante l’esposizione ad acqua contaminata), *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Enterobacter* spp. In uno studio condotto su 17 epidemie ospedaliere sostenute da tali batteri (dove per epidemia ospedaliera si intende il verificarsi di 2 o più casi confermati di infezione nosocomiale nell’arco di 6 mesi all’interno della stessa struttura) è emersa una resistenza ad almeno 2 categorie di antibiotici nel 76% dei casi esaminati. Tale risultato fornisce

una stima della complessità della gestione clinica di questo tipo di infezioni. Altri importanti patogeni idrodiffusi sono rappresentati da micobatteri atipici quali *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. marinum*; funghi, tra cui *Aspergillus spp.* e *Fusarium spp.*; virus come Norovirus e protozoi, come ad esempio *Cryptosporidium* e *Giardia*. Tra i protozoi ve ne sono, inoltre, alcuni (*Acanthamoeba spp.* in primo luogo) che contribuiscono al verificarsi delle infezioni nosocomiali da batteri idrodiffusi poiché instaurano con essi relazioni simbiotiche, proteggendoli in tal modo da eventuali misure di controllo della colonizzazione batterica quali l'uso di un disinfettante o lo shock termico.

Tuttavia, il patogeno più rilevante è sicuramente *Legionella spp.*, sia per la sua ubiquitarità in generale negli ambienti acquatici e quindi anche nelle condutture dell'acqua (così come in varie altre strutture - torri di raffreddamento, umidificatori, serbatoi di acqua calda, etc.), sia per le sue caratteristiche di intrinseca resistenza a varie procedure di bonifica ambientale già efficaci su altri microrganismi. Per tali motivi, si può affermare che il controllo del rischio idrico legato a infezioni nosocomiali sostenute da batteri appartenenti al genere *Legionella* sia assumibile come paradigma della gestione generale del rischio idrico in ambiente sanitario correlato a patogeni idrodiffusi. La necessità della prevenzione della legionellosi è doverosa in molti ambienti di lavoro e soprattutto in ambito ospedaliero dal momento che *Legionella spp.* è implicata nei casi di infezioni di ordine nosocomiale in seguito alla mancata applicazione delle norme di buona pratica per la manutenzione degli impianti idrici delle strutture sanitarie. In Italia al momento attuale non esistono norme relative alla qualità dell'acqua ospedaliera che indichino i valori di riferimento per i patogeni summenzionati. La legge sopra citata (DL 31/2001) riporta i criteri di potabilità delle acque destinate al consumo umano, con attenzione da un punto di vista microbiologico alla prevenzione delle infezioni idrodiffuse a

trasmissione orofecale (valutazione della carica microbica a 22°C e 36°C, ricerca di coliformi totali, coliformi fecali, streptococchi fecali, clostridi solfito-riduttori). Quindi, non vengono prese in considerazione le infezioni sostenute da patogeni idrodiffusi opportunisti, che peraltro riconoscono diverse modalità di trasmissione, come l'inalazione di aerosol e l'aspirazione di acqua contaminata per quanto riguarda *Legionella* spp. o l'infezione per contatto da *Pseudomonas aeruginosa*.

Dal momento che è stato dimostrato che l'entità della contaminazione delle reti idriche ospedaliere è proporzionale al rischio di contrarre infezioni nosocomiali idrodiffuse e che parimenti in ospedali le cui reti idriche non siano contaminate non si verificano casi di infezioni nosocomiali da patogeni veicolati dall'acqua, si comprende come l'impostazione di una corretta strategia di controllo del rischio idrico in ambiente ospedaliero costituisca un ambito di ricerca rilevante nella gestione della salute pubblica.

A tale proposito si sottolinea l'importanza del Documento “ Linee Guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi” approvato dalla Conferenza permanente tra lo stato, le regioni e le province autonome di Trento e Bolzano il 4 Aprile 2000, in cui si individua la tipologia degli impianti idrici a maggior rischio di contaminazione, i punti di maggiore criticità nonché gli interventi per una corretta manutenzione e bonifica.

## **1.2 La Legionella**

Le legionelle sono presenti negli ambienti acquatici naturali e artificiali: si riscontrano nelle sorgenti, comprese quelle termali, nei fiumi, laghi, vapori, terreni. Da questi ambienti esse raggiungono quelli artificiali come condotte cittadine e impianti idrici degli edifici, quali serbatoi, tubature, fontane e piscine (sono state rilevate anche in fanghi di fiume o torrente, o argilla per

manufatti in terracotta), ma anche plastica, gomma, legno e sedimenti organici.

A seguito di queste peculiarità, ad oggi non esistono soluzioni definitive e uniformate per prevenire le contaminazioni ambientali da *Legionella*, è necessario quindi un lavoro coordinato d'equipe con il coinvolgimento di più professionalità; il problema deve essere affrontato nell'aspetto impiantistico attraverso un'accurata progettazione, realizzazione e manutenzione dei relativi impianti. Nel caso di contaminazione devono essere individuati i punti critici nell'impianto di distribuzione dell'acqua e adottati efficaci sistemi di bonifica ambientale.

Nonostante le conoscenze su questo batterio si siano ampiamente sviluppate dal 1976, anno della prima identificazione, ad oggi, i casi di "legionellosi" rimangono comuni in Italia come nel resto del mondo e questo continua a suscitare un crescente interesse fra gli addetti ai lavori, ma anche nella popolazione generale. Si è osservato un po' ovunque nei Paesi industrializzati un notevole incremento del numero di casi e questo può essere attribuito sia al miglioramento degli strumenti diagnostici disponibili e alla maggiore sensibilità dei clinici nei confronti della malattia, sia ai mutati stili di vita della popolazione che tendono ad aumentare le occasioni di esposizione all'agente eziologico (incremento del turismo, della frequentazione di centri-benessere etc.) e alla sempre più diffusa installazione di impianti di condizionamento centralizzati negli ambienti ad uso collettivo, dotati di torri di raffreddamento e/o condensatori evaporativi. Essendo il microrganismo ubiquitario, la malattia può manifestarsi con epidemie dovute ad un'unica fonte con limitata esposizione nel tempo e nello spazio all'agente eziologico, oppure con una serie di casi indipendenti in un'area ad alta endemia o con casi sporadici senza un evidente raggruppamento temporale o geografico. Focolai epidemici si sono ripetutamente verificati in ambienti collettivi a residenza temporanea, come

ospedali o alberghi, navi da crociera, esposizioni commerciali, ecc. I casi di polmonite da *Legionella* di origine comunitaria si manifestano prevalentemente nei mesi estivo-autunnali, mentre quelli di origine nosocomiale non presentano una particolare stagionalità.

"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 con tasso di mortalità variabile tra 10-15%, sia in forma febbrile extrapolmonare o in forma subclinica. La specie più frequentemente coinvolta in casi umani è *L. pneumophila*, il cui nome significa letteralmente "legionella amante dei polmoni". Questo termine fu coniato a seguito di un raduno di circa 4400 ex combattenti del Vietnam (*legionnaires*) tenutosi presso un hotel di Philadelphia nel luglio del 1976. Nel corso di questo evento circa 220 partecipanti si ammalarono di una grave forma di infezione polmonare ancora sconosciuta e 34 di questi morirono dopo pochi giorni.

Gli accertamenti medici che ne seguirono, stabilirono che le infezioni polmonari erano imputabili alla proliferazione di batteri di origine ignota. Le caratteristiche epidemiologiche e cliniche della forma morbosa da subito hanno indirizzato gli studiosi nell'individuare, come causa infettiva, una sorgente comune rispetto ad una potenziale trasmissione da persona a persona. Nello stesso tempo fu individuato da 2 a 10 giorni il periodo di incubazione. Nel gennaio dell'anno successivo il Dott. Joseph McDade, ricercatore del *Center for Disease Control di Atlanta (CDC)*, isolò un batterio dal tessuto polmonare di uno dei pazienti deceduti, al quale fu dato il nome di *Legionella pneumophila*. La sorgente di infezione venne poi individuata nell'impianto di aria condizionata presente nell'hotel.

Tale scoperta fu l'inizio di un percorso "a ritroso" nel tempo alla ricerca di casi simili avvenuti a seguito di epidemie di origine sconosciuta. Il caso più

datato risale al 1947 ed è riferito alla morte di un soldato avvenuta nello Stato della North Carolina per una polmonite non identificata.

In Italia i primi casi, dei quali si hanno notizie, risalgono al luglio 1978 e riguardano un gruppo di turisti danesi ai quali era stata diagnosticata la “malattia dei legionari” al loro rientro nel paese di origine e che avevano soggiornato in una struttura alberghiera del Lago di Garda.

### **1.2.1. Caratteristiche microbiologiche**

Attualmente *Legionella* nere appartenente alla famiglia *Legionellaceae*, sono note almeno 57 diverse specie (sottospecie incluse) e circa 70 sierogruppi, ma non tutte sono state associate a casi di malattia nell'uomo.

*Legionella pneumophila* è la specie più frequentemente rilevata nei casi diagnosticati (Fields *et al.*, 2002; Diederer, 2008) ed è costituita da 16 sierogruppi di cui *Legionella pneumophila* sierogruppo 1, responsabile dell'epidemia verificatasi a Philadelphia (USA) nel 1976, è causa del 95% delle infezioni in Europa e dell'85% nel mondo, seguita da *L. longbeachae* (3,9%) e *L. bozemanii* (2,4%), mentre altre specie, meno frequentemente isolate in campioni clinici, sono *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. feeleii*, *L. wadsworthii* e *L. anisa* (2,2% in totale) (Yu *et al.*, 2002).

Non è nota la dose infettante per l'uomo. Neppure si conoscono le ragioni della diversa virulenza nelle differenti specie e sierogruppi di *Legionella* che, tuttavia, potrebbero essere attribuite alla idrofobicità di superficie, alla stabilità nell'aerosol e alla capacità di crescere all'interno delle amebe. Non è noto neppure lo stato fisiologico di *Legionella* che causa l'infezione, ma esso può includere sia la fase stazionaria di crescita sia la logaritmica, come pure le cosiddette *spore-like forms*.

Lo stato fisiologico di *Legionella* può essere importante in relazione alla virulenza, poiché essa aumenta quando il batterio è cresciuto nelle amebe, nella tarda fase stazionaria o quando è nella forma spore-like.

*Legionella* è un bacillo Gram-negativo. Questi batteri sono aerobi, asporigeni, mobili per la presenza di uno o più flagelli ed hanno dimensioni che vanno da 0,3 a 0,9 µm di larghezza, da 1,5 a 5 µm di lunghezza, mentre in coltura sono frequenti forme filamentose lunghe fino a 20 µm. Anche se sono Gram-negativi, la parete cellulare delle legionelle è atipica per la presenza di acidi grassi a catena ramificata, mentre, sotto l'aspetto biochimico questi batteri non mostrano alcuna attività fermentativa dei carboidrati ma hanno una debole attività ossidasica e catalasica e una buona attività gelatinasica. La fonte di energia per il mantenimento dello stato vitale delle legionelle è presente in alcuni amminoacidi come cisteina, arginina, isoleucina, metionina e la loro crescita è stimolata da composti del ferro. E' da tener presente l'attività di autofluorescenza di alcune specie di *Legionella*, ad esempio *L. bozemanæ* e *L. gormanii* mostrano una fluorescenza blu-bianca se illuminate da luce UV. *L. pneumophila* e *L. micdadei* non sono fluorescenti.

Le legionelle sono ampiamente diffuse in natura, in particolar modo risultano essere associate alla presenza di acqua (superfici lacustri e fluviali, sorgenti termali, falde idriche ed ambienti umidi in genere). Esse prediligono gli habitat acquatici caldi: si riproducono tra 25 e 42°C, ma sono in grado di sopravvivere in un range di

può sopravvivere per diverse ore a 50°C mentre a 70° C, quando non si trova in simbiosi con alcuni microrganismi (Garcia, 2007), esso viene distrutto in modo istantaneo (Yu, 2000). Questi batteri presentano anche una buona sopravvivenza in ambienti acidi e alcalini, sopportando valori di pH compresi tra 5,5 e 8,1. La facilità con cui *Legionella* si riproduce



nell'ambiente naturale è in contrasto con la difficoltà a crescere sui terreni di coltura artificiali dal momento che le legionelle per poter essere isolate in laboratorio necessitano di terreni di crescita molto selettivi, spesso caratterizzati da antibiotici in modo da poter favorire solo l'isolamento di *Legionella*.

Il paradosso esistente tra l'ubiquitarietà delle legionelle in ambiente naturale e la difficoltà di crescita in un contesto artificiale può essere spiegato dalla capacità di questi batteri di entrare e moltiplicarsi all'interno di protozoi ciliati ed amebe, i quali costituiscono una fonte di nutrimento e di protezione dalle condizioni ambientali sfavorevoli grazie anche alla capacità delle amebe di produrre forme di resistenza come le cisti. L'infezione all'interno di protozoi permette ai batteri di acquisire una spiccata virulenza. Occorre anche tener conto della capacità delle legionelle di formare biofilms, infatti, negli impianti idrici è possibile trovare la presenza di legionelle sia in forma libera che in forma ancorata al biofilm, il quale viene definito come una comunità microbica costituita da microrganismi (batteri, protozoi, virus, miceti etc.) adesi irreversibilmente ad un substrato e immersi in una matrice esopolisaccaridica prodotta da essi stessi (Dunne *et al.*, 2002). I biofilm costituiscono un terreno fertile per molti germi patogeni come *E. coli* o *Legionella*, proteggendoli da influenze chimico-fisiche. I microrganismi presenti nei biofilm sono estremamente resistenti ai disinfettanti.

Si può supporre che anche i batteri acquatici possano influenzare positivamente o negativamente la sopravvivenza di *Legionella*. Molti batteri ad esempio possono esprimere una attività inibente nei confronti di *Legionella* grazie alla possibilità di produrre batteriocine o Bacteriocin-Like Substances (BLS), molecole di natura proteica dotate di potere inibente nei confronti di microrganismi appartenenti alla stessa specie o strettamente correlata.

Questo aspetto merita una considerazione per un possibile futuro utilizzo di tali microrganismi produttori nel confronto della diffusione del patogeno. ([http://www.ricercaitaliana.it/grandi\\_temi/dettaglio\\_sezione-193.htm](http://www.ricercaitaliana.it/grandi_temi/dettaglio_sezione-193.htm) - Portale Nazionale della Ricerca Italiana - MiUR).

### **1.2.2. Condizioni ideali per lo sviluppo della *Legionella pneumophila***

I batteri della *Legionella* sono presenti nei fiumi, nei laghi, nei pozzi e nelle acque termali. Possono essere presenti anche negli acquedotti, in quanto sono in grado di superare, senza eccessivi danni, i normali trattamenti di potabilizzazione. Ad esempio alle normali concentrazioni di cloro per acqua potabile (0,2 ppm) questi batteri non subiscono alcuna azione. Comunque, la sola presenza di questi batteri non costituisce pericolo per le persone. I batteri diventano pericolosi solo quando sussistono contemporaneamente le seguenti condizioni:

- 1) *Temperatura ottimale di sviluppo varia da 25°C a 42°C. La crescita dei batteri è massima a circa 37°C.*
- 2) *Presenza di ambiente aerobico*
- 3) *Presenza di elementi nutritivi, biofilm, scorie, ioni di ferro e di calcare, altri microrganismi*
- 4) *Nebulizzazione dell'acqua con formazione di microgocce aventi diametri variabili da 1 a 5 micron*
- 5) *Alto livello di contaminazione, generalmente si ritiene che tale livello debba superare i 1000 CFU/L.*

CFU /L (o UFC: unità formanti colonie) è l'unità di misura con cui si valuta la contaminazione dell'acqua e indica la quantità di microorganismi presenti in un litro d'acqua.

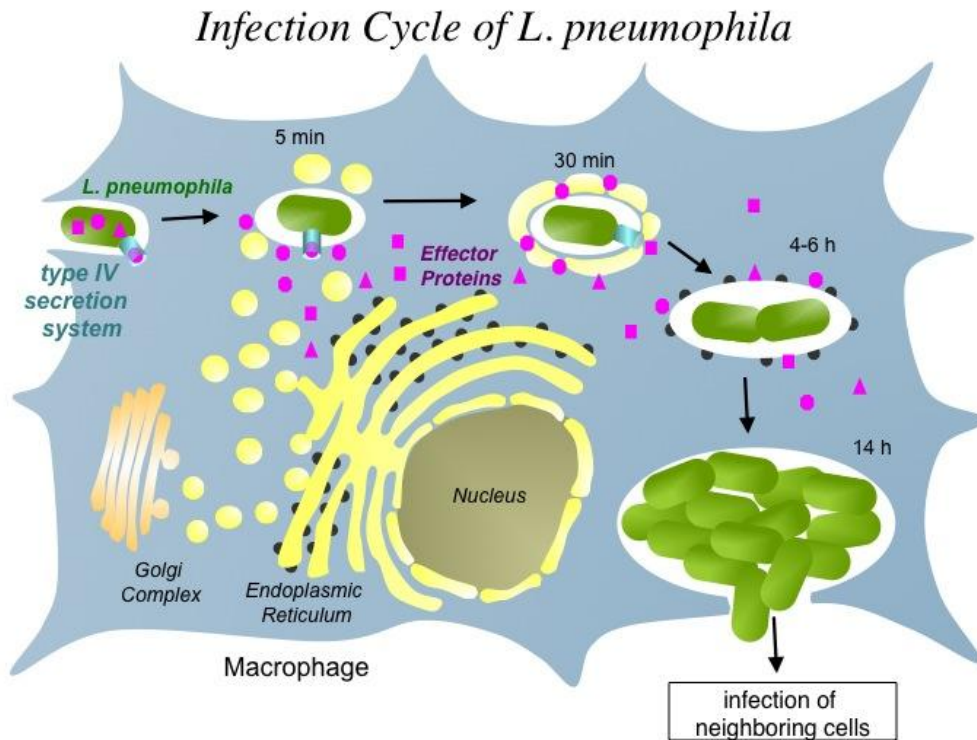
Fattori chimici che possono condizionare lo sviluppo di *Legionella* sono riferibili agli ioni d'Argento (Ag<sup>++</sup>) e Rame (Cu<sup>++</sup>) che risultano inibitori,

quindi, secondo alcuni autori, le tubature in rame inibiscono la colonizzazione. Per contro, i siliceni, il teflon, favoriscono l'adesione e il caucciù (giunti e ranelle) favoriscono uno sviluppo intenso. In genere, tutti i materiali che rilasciano in un ambiente liquido delle particelle organiche utilizzabili microbiologicamente favoriscono la colonizzazione da parte della *Legionella* (si pensi ai diversi tipi di plastiche).

### **1.2.3. Modalità di trasmissione e patogenesi**

La legionellosi viene normalmente acquisita per via respiratoria mediante inalazione, aspirazione o microaspirazione di aerosol contenente *Legionella*, oppure di particelle derivate per essiccamento. Le goccioline si possono formare sia spruzzando l'acqua che facendo gorgogliare aria in essa, o per impatto su superfici solide. La pericolosità di queste particelle di acqua è inversamente proporzionale alla loro dimensione. Gocce di diametro inferiore a 5 $\mu$  arrivano più facilmente alle basse vie respiratorie. Sono stati inoltre segnalati in letteratura casi di legionellosi acquisita attraverso ferita (Brabender *et al.*, 1983; Lowry *et al.*, 1991; Lowry and Tompkins, 1993). Non è mai stata dimostrata la trasmissione interumana della malattia. Una volta penetrati nell'organismo, i batteri raggiungono i polmoni dove vengono fagocitati dai macrofagi alveolari, che però non sono in grado di uccidere o inibire la crescita; le legionelle riescono, infatti, ad eludere i meccanismi microbicidi dei fagociti e si moltiplicano all'interno di questi fino a provocarne la lisi, con conseguente rilascio di una progenie batterica che può infettare altre cellule (Figura 1). Alla base della patogenesi dell'infezione vi è quindi la capacità delle legionelle di moltiplicarsi all'interno dei macrofagi. Penetrano in queste cellule per fagocitosi e una volta all'interno sono incorporate in un vacuolo "specializzato" che non viene attaccato dagli enzimi dei macrofagi alveolari deputati alla eliminazione degli agenti patogeni. Pur non essendoci riscontri

scientifici precisi, si ritiene comunemente che le concentrazioni di *Legionella* comprese tra  $10^2$  e  $10^4$ /L siano idonee a provocare un caso di infezione l'anno, mentre cariche comprese tra  $10^4$  e  $10^6$ /L possono provocare casi sporadici ([http: www.travelclinic.it](http://www.travelclinic.it) ).



**Fig.1** – Rappresentazione schematica della moltiplicazione di *L. pneumophila* all'interno dei macrofagi alveolari

Mentre la maggior parte dei primi casi di legionellosi sono stati attribuiti a particelle di acqua aerodisperse, contenenti batteri provenienti da torri di raffreddamento o condensatori evaporativi o sezioni di umidificazione delle unità di trattamento dell'aria, le infezioni più recenti sono risultate causate anche dalla contaminazione di impianti di acqua potabile, apparecchi sanitari, fontane e umidificatori ultrasonici (Tabella 1).

Eventi epidemici verificatisi in vari Paesi, che hanno riguardato frequentatori di fiere ed esposizioni nelle quali si sono create condizioni di rischio di infezione da sistemi generanti aerosol (piscine e vasche da

idromassaggi, esposte a fini dimostrativi, e fontane decorative), suggeriscono l'opportunità di considerare anche queste manifestazioni nell'anamnesi dei casi e nell'indagine epidemiologica.

In Australia, Nuova Zelanda, Giappone, negli Stati Uniti e nel Regno Unito sono state descritte a più riprese delle infezioni da *Legionella longbeachae* associate all'utilizzo di terricci o composti (Cameron *et al.*, 1991).

**Tab.1** - Principali modalità e sorgenti di trasmissione della *Legionella* sp.

<b>MODALITA'</b>	<b>FONTE</b>
Inalazione di aerosol	contaminazione dell'impianto idrico, torri di raffreddamento degli impianti di condizionamento, umidificazione centralizzata degli impianti, apparecchi per aerosol e ossigenoterapia
Aspirazione	Sonda naso-gastrica, colonizzazione dell'orofaringe
respirazione assistita	contaminazione delle apparecchiature per la respirazione assistita

#### **1.2.4 Fattori di rischio**

Fattori predisponenti la malattia sono l'età avanzata, il fumo di sigaretta, la presenza di malattie croniche, l'immunodeficienza. 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* presente 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, determinano l'espressione clinica dell'infezione. La suscettibilità individuale è condizionata dalla presenza di alcuni specifici fattori di rischio. Essi sono costituiti dalla presenza di alcune patologie di base, quali BPCO, neoplasie, insufficienza cardiaca, diabete, insufficienza renale

terminale; dallo stato di immunosoppressione legato sia a prolungate terapie corticosteroidi sia a trapianti d'organo; da interventi chirurgici soprattutto otorinolaringoiatrici. Esistono divergenze in letteratura circa il rischio relativo di contrarre questa infezione associato alla sindrome da immunodeficienza acquisita. Esistono poi altre condizioni predisponenti, quali il sesso maschile e l'età avanzata, il deficit della funzione di clearance mucociliare (quale si osserva nei forti fumatori o negli alcolisti cronici), la presenza di sondino naso-gastrico (Tabella 2).

**Tab.2** - Fattori di rischio e malattie di base che favoriscono l'acquisizione di una polmonite da *Legionella* spp

<b>FATTORI DI RISCHIO</b>	<b>MALATTIE DI BASE</b>
età avanzata	broncopneumopatia cronica ostruttiva
Presenza di Legionella in più del 30% dei campioni d'acqua analizzati	immunosoppressione: ✓ trapianto d'organo ✓ terapia corticosteroidica
Alcolismo	neoplasie e interventi chirurgici ORL
Tabagismo	insufficienza renale terminale
Sonda nasogastrica, alimentazione con sondino	insufficienza cardiaca
Inalazione di acqua non sterile	Diabete
sesso maschile	
Presenza di torri di raffreddamento degli impianti di condizionamento nell'area circostante	

E' difficile comunque stimare il rischio reale di un singolo individuo; esistono infatti recenti evidenze che indicano come anche l'assetto genetico possa influenzare la suscettibilità. Ad esempio sono state identificate alcune mutazioni sui geni che codificano per una famiglia di recettori di membrana importanti per l'efficienza della immunità naturale, i recettori toll-like, associate ad una maggiore suscettibilità nei confronti di *Legionella pneumophila*. Parimenti è stata sottolineata l'importanza della produzione

di INF- $\gamma$  come fattore difensivo nei confronti di *Legionella pneumophila*, e in modelli sperimentali murini è stata dimostrata l'importanza dell'azione di questo interferone prodotto attraverso l'attivazione della proteina MyD88 (myeloid differentiation primary response gene-88) nel potenziare la funzione delle cellule NK contro *Legionella*, ed è stata avanzata l'ipotesi che mutazioni a carico di questa proteina esponano ad un maggior rischio di contrarre questa patologia.

Si comprende anche alla luce di queste asserzioni come il rischio di contrarre questa patologia sia molto alto negli ospedali ed in particolar modo nei reparti che ospitano continuamente pazienti con i fattori di rischio di cui sopra citati, e come parimenti sia difficile conoscere al contempo tutti i fattori che possano entrare in gioco nel determinismo della patologia.

Malgrado il carattere ubiquitario di *Legionella*, la malattia umana rimane rara; i tassi d'attacco nel corso di focolai epidemici sono bassi, inferiori al 5% (Edelstein, 1993).

### **1.2.5 Clinica**

La legionellosi può manifestarsi sia in forma di polmonite, sia in forma extrapolmonare o in forma sub clinica:

**La Malattia dei Legionari** è la forma più severa della infezione, con una letalità media del 10%, che può arrivare fino al 30-50% nel caso di infezioni ospedaliere. Dopo un periodo di incubazione variabile da 2 a 10 giorni (in media 5-6 giorni), si manifesta come una polmonite infettiva, con o senza manifestazioni extrapolmonari. La sindrome pneumonitica non ha caratteri di specificità né clinici né radiologici. Nei casi classificabili come gravi secondo il punteggio "pneumonia severity index" (Fine *et al.*, 1997) può insorgere bruscamente con febbre, dolore toracico, dispnea, cianosi, tosse produttiva associati alla obiettività fisica semeiologica del

consolidamento polmonare. Nei casi classificabili come di gravità lieve (ma che poi se non adeguatamente trattati possono evolvere in polmonite grave) l'esordio può essere insidioso con febbre, malessere, osteoartralgie, tosse lieve, non produttiva. I quadri radiologici sono patognomonicamente potendosi riscontrare addensamenti di tipo alveolare focali, singoli o multipli, monolaterali o disseminati con o senza evoluzione escavativa, come quadri inizialmente a impegno interstiziale.

A volte possono essere presenti sintomi gastrointestinali, neurologici e cardiaci; alterazioni dello stato mentale sono comuni, generalmente non associati a meningismo. Il paziente affetto da legionellosi, a impronta sistemica possono essere presenti uno o più dei seguenti segni e sintomi: bradicardia relativa, lieve aumento delle transaminasi, ipofosfatemia, diarrea e dolore addominale (Tabella 3).

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



**Tab. 3** - Manifestazioni extrapolmonari della Malattia dei Legionari

Manifestazioni extrapolmonari comuni	Manifestazioni extrapolmonari rare
Neurologiche: ✓ confusione ✓ disorientamento ✓ letargia	✓ insonnia ✓ allucinazioni ✓ delirio ✓ atassia ✓ accesso cerebrale ✓ deficit neurologici focali ✓ amnesia retrograda ✓ convulsioni ✓ neuropatia periferica ✓ corea ✓ encefalomyelite ✓ vertigini
Gastrointestinali: ✓ nausea ✓ vomito ✓ feci non formate/diarrea ✓ dolore addominale	✓ epatomegalia ✓ peritonite ✓ accesso perirettale ✓ accesso appendicolare ✓ pancreatite ✓ colite
Renali: ✓ proteinuria ✓ ematuria	✓ insufficienza renale ✓ nefrite-acuta tubolointerstiziale ✓ accesso renale ✓ glomerulonefrite
Testa/occhi/orecchi: ✓ nessuna	✓ sinusite
Cardiache: ✓ nessuna	✓ miocardite ✓ pericardite ✓ effusione pericardica ✓ torsione della punta
Tessuti molli/pelle: ✓ nessuna	✓ cellulite ✓ accesso cutaneo ✓ infezione di ferite

La polmonite da *Legionella* non ha quindi caratteristiche cliniche che permettano di distinguerla da altre forme atipiche o batteriche di polmonite comunitaria, né ha stimate specifiche che consentano di sospettarla tra le eziologie di polmonite nosocomiale e/o dell'ospite immunocompromesso.

Come tale va sempre sospettata sul piano clinico tra le infezioni polmonari comunitarie e nosocomiali. Non a caso le linee guida della American Thoracic Society (American Thoracic Society, 2005) prevedono antibiotici sempre attivi verso *Legionella* anche per le polmoniti comunitarie di lieve gravità e di considerare la eziologia in tutte le forme nosocomiali sino a quanto non venga esclusa dalle indagini di laboratorio (American Thoracic Society, 2005; Mandell *et al.*, 2007)

**La Febbre di Pontiac**, dopo un periodo di incubazione di 24-48 ore, si manifesta in forma acuta simil-influenzale senza interessamento polmonare, e si risolve in 2-5 giorni. I prodromi sono: 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 Febbre di Pontiac deve il proprio nome ad una epidemia di febbre acuta verificatesi nell'omonima località del Michigan (USA) nel 1968. Questa prima epidemia è stata causata da *L. pneumophila* di sierogruppo 1 mentre epidemie successive sono state attribuite a *L. feeleii*, *L. anisa* e *L. micdadei*.

### **1.2.6 Diagnosi di laboratorio in campioni clinici e ambientali**

La polmonite da *Legionella* ha dei sintomi che sono spesso indistinguibili da polmoniti causate da altri microrganismi e, per questo motivo, la diagnosi di laboratorio della legionellosi deve essere considerata complemento indispensabile alle procedure diagnostiche cliniche. Gli accertamenti di laboratorio devono essere attuati possibilmente prima che i risultati possano essere influenzati dalla terapia e devono essere richiesti al fine di attuare una terapia antibiotica mirata, contenere così l'uso di antibiotici non necessari, evitare effetti collaterali, l'insorgenza di microrganismi antibiotico resistenti, ed in ultimo, ma non meno importante, ridurre i tempi di degenza e le spese sanitarie del nostro paese.

Test diagnostici per la legionellosi dovrebbero essere idealmente eseguiti in tutti i seguenti casi di polmonite:

- in pazienti con malattia severa che richieda il ricovero in un reparto di terapia intensiva;
- in pazienti che riferiscano fattori di rischio (BPCO, neoplasie, diabete, insufficienza cardiaca, immunodepressione)
- in pazienti che siano stati esposti a *Legionella* durante un'epidemia;
- in pazienti in cui nessun'altra eziologia è probabile.

La sensibilità e specificità dei metodi diagnostici per *L. pneumophila* sierogruppo 1 sono elevate mentre sono inferiori per altri sierogruppi di *L. pneumophila* o per altre specie di *Legionella*.

I metodi di diagnosi per l'infezione da *Legionella* correntemente utilizzati sono i seguenti:

- Isolamento del batterio mediante coltura;
- Rilevazione di anticorpi su sieri nella fase acuta e convalescente della malattia;
- Rilevazione dell'antigene urinario;
- Rilevazione del batterio nei tessuti o nei fluidi corporei mediante test di immunofluorescenza;
- Rilevazione del DNA batterico mediante PCR (metodo non ancora validato).

L'isolamento mediante coltura è considerato il metodo diagnostico di elezione per la diagnosi di Legionellosi. I campioni dovrebbero essere prelevati prima del trattamento antibiotico, sebbene *Legionella* sia stata isolata da secrezioni del tratto respiratorio e dal sangue anche dopo alcuni giorni di trattamento con eritromicina. I campioni del tratto respiratorio (BAL, tracheoaspirato, liquido pleurico) e il parenchima polmonare, dovrebbero essere tempestivamente coltivati (Stout *et al.*, 2003). Inoltre,

un'emocoltura negativa, seminata successivamente su terreno appropriato per *Legionella*, può dar luogo all'isolamento del microrganismo.

In alcuni casi *Legionella* è stata trovata in campioni provenienti da siti extrapolmonari, specialmente in campioni autoptici ( fegato, milza, fluido pericardico, reni, ascessi cutanei).

L'isolamento del batterio richiede terreni di coltura specifici poiché *Legionella* non cresce sui terreni di uso comune, ed ha tempi di crescita relativamente lunghi (4-10 giorni).

L'analisi dei campioni clinici mediante coltura è estremamente importante, perché è il criterio diagnostico più specifico, permette l'isolamento di tutte le specie e sierogruppi e consente lo studio comparativo con ceppi di *Legionella* isolati dall'ambiente, presumibilmente associati all'infezione, al fine di individuare la fonte dell'infezione stessa.

L'uso di colorazioni batteriologiche può essere solo parzialmente utile. Tuttavia, è necessario prendere in considerazione una diagnosi di legionellosi se si osservano batteri Gram-negativi nelle secrezioni delle basse vie respiratorie di un paziente immunocompromesso, con una coltura negativa dopo 24 ore sui terreni di uso corrente. La coltura è particolarmente importante per la diagnosi in alcuni casi: pazienti in cui la polmonite è severa e causa insufficienza respiratoria, pazienti immunocompromessi, infezioni nosocomiali e casi in cui si sospetta che la causa sia *Legionella* appartenente a specie differenti da *L. pneumophila* sierogruppo 1.

La presenza dell'antigene solubile di *Legionella* nelle urine (antigenuria) si rileva nella maggior parte dei pazienti da uno a tre giorni dopo l'insorgenza dei sintomi, con un picco a 5-10 giorni; può persistere per alcune settimane o mesi, soprattutto in pazienti immunocompromessi, dove può persistere per quasi un anno (Kohler *et al.*, 1984). Inoltre essendo la sensibilità al test spesso associata alla gravità della malattia (Yzerman *et al.*, 2002) per

evitare una mancata diagnosi, nei casi di polmonite meno grave, si dovrebbe fare ricorso ad altri test diagnostici. La sua presenza, tuttavia, può essere a volte intermittente, ma si rileva anche in corso di terapia antibiotica (Luck *et al.*, 2002). Questo test è attualmente validato esclusivamente per *L.pneumophila* sierogruppo 1, anche se, in una certa percentuale di casi, è stata riscontrata positività a seguito di infezioni causate da altri sierogruppi di *Legionella* (Benson *et al.*, 2000; Olsen *et al.*, 2009).

Pertanto la positività del test non implica necessariamente che l'agente eziologico sia *L. pneumophila* sierogruppo 1 anche se questa è la situazione più frequente. La conferma può essere ottenuta solo con l'utilizzo di altri metodi diagnostici (coltura, sierologia).

La determinazione può essere effettuata attraverso due metodi: metodo immunoenzimatico (EIA) e metodo immunocromatografico (ICT).

L'EIA ha una specificità dell'80–85%, simile a quella della coltura (Hackman *et al.*, 1996; Kazandjian *et al.*, 1997), ma una sensibilità maggiore. La determinazione dell'antigene urinario mediante EIA è il metodo di scelta per la diagnosi di infezione da *L. pneumophila* sierogruppo 1 (Cosentini *et al.*, 2001; Formica *et al.*, 2001; Svarrer *et al.*, 2011).

Il metodo immunocromatografico è un saggio molto rapido (15 min-1h) per la rilevazione dell'antigene di *L. pneumophila* sierogruppo 1 che non richiede particolari attrezzature di laboratorio. L'interpretazione dei risultati si basa sulla presenza o meno di due bande colorate, una del campione e l'altra del controllo. Qualsiasi linea visibile dà un risultato positivo. Tuttavia, campioni con bassa concentrazione di antigene potrebbero dare una linea di campione debole che può essere considerata "positiva" con sicurezza se aumenta in intensità, dopo 45' dalla prima osservazione. Se la banda debole non aumenta di intensità, soprattutto nei casi in cui le urine sono patologiche in partenza (infezioni urinarie, proteinuria, ecc.) il referto

deve essere formulato come dubbio, in attesa di essere confermato da altri test (Helbig *et al.*, 2001). La concentrazione delle urine migliora la sensibilità sia dell'EIA che dell'ICT senza diminuire la specificità. Confrontato con altri metodi diagnostici l'antigene urinario presenta evidenti vantaggi: i campioni sono ottenuti facilmente, è rilevabile nelle fasi precoci della malattia e il test è facile e rapido da effettuare, oltre che specifico. Inoltre può essere rilevato anche nella febbre di Pontiac (Burnsed *et al.*, 2007). Uno svantaggio consiste nel fatto che proprio per la sua persistenza, può risultare difficile distinguere tra infezione acuta, fase di convalescenza o infezione pregressa. In questi casi sospetti, in presenza di segni clinici di polmonite, oltre al test dell'antigene urinario andrebbe effettuato un ulteriore test diagnostico (esame colturale, sierologico e PCR), anche se, come dimostrato da recenti studi (Svarrer *et al.*, 2011) questa pratica dovrebbe essere sempre adottata a causa della non elevata sensibilità soprattutto del test immunocromatografico. Un altro limite del test è che rileva prevalentemente gli antigeni di *L.pneumophila* sierogruppo 1. Inoltre, benché la sensibilità complessiva del test sia del 75-99% per infezioni dovute a tale microrganismo, è da rilevare che la sensibilità può variare in particolari sottopopolazioni: pazienti con legionellosi associata ai viaggi, legionellosi acquisita in comunità e nosocomiale. Infatti, in queste tre categorie la sensibilità è rispettivamente 94%, 76-87% e 44-46% (Helbig *et al.*, 2003). Queste differenze sono dovute al fatto che il test rileva principalmente alcuni ceppi di *L. pneumophila* che sono predominanti nei casi di legionellosi associate ai viaggi. Falsi positivi sono stati descritti in pazienti con malattia da siero (Deforges *et al.*, 1999) e in infezioni ascrivibili a *Nocardia asteroides* (Bailleul *et al.*, 2004). Uno studio sistematico che ha saggiato il test con numerosi ceppi di *Legionella* ha rilevato una totale assenza di reattività di antigeni di specie di *Legionella non-pneumophila* (Okada *et al.*, 2002).

I metodi sierologici, come l'immunofluorescenza indiretta (IFI), sono utili per indagini epidemiologiche retrospettive ma sono meno validi per quelle cliniche, data la comparsa talvolta tardiva degli anticorpi specifici a livelli significativi e della necessità di controllare un ulteriore campione di siero in fase di convalescenza. Un aumento significativo del titolo anticorpale si presenta da 1 a 9 settimane dopo l'insorgenza della malattia in circa i tre quarti dei pazienti con coltura positiva per *L. pneumophila* sierogruppo 1. In media i pazienti sviluppano anticorpi in due settimane, tuttavia oltre il 25% delle sieroconversioni non vengono rilevate perché i sieri non vengono correttamente prelevati nella fase precoce e convalescente della malattia. Inoltre la determinazione della classe anticorpale non è d'aiuto nel differenziare tra un'infezione in atto o un'infezione pregressa. In alcuni studi le IgM si riscontrano precocemente, altri studi hanno dimostrato che in questa fase ci sono sia IgM che IgG. In alcuni pazienti inoltre sono state riscontrate solo le IgG o solo le IgM, oppure possono persistere a lungo le IgM. Le IgA possono essere presenti in infezioni recenti ma vanno incontro a degradazione. Per questo motivo è opportuno utilizzare un test che metta in evidenza tutte le classi anticorpali. Un aumento di quattro volte o più del titolo anticorpale tra due sieri prelevati nella fase acuta e convalescente della malattia ha valore diagnostico. Un risultato positivo su un singolo siero ( $\geq 256$ ) ha un valore diagnostico presuntivo. La definizione di questi criteri aiuta ad evitare falsi positivi dovuti a reazioni crociate con altri patogeni. In generale, il metodo sierologico ha un valore predittivo positivo (proporzione di realmente malati tra i positivi al test) piuttosto basso. Inoltre si possono avere falsi negativi a causa della scarsa risposta anticorpale di pazienti con polmonite da *Legionella* che, generalmente hanno difese immunitarie compromesse oppure a causa della sieroconversione a volte molto tardiva, oppure semplicemente a causa dell'età avanzata in cui si verifica un naturale declino della risposta

immunitaria. La sieroconversione può anche non essere osservata se nel test si utilizza un antigene non omologo (esistono ad esempio diversi sottotipi di *L. pneumophila*) che non reagisce con gli anticorpi sviluppati dal contatto con un altro sottotipo che può aver causato l'infezione. Si deve infine rilevare che la specificità e la sensibilità dell'immunofluorescenza indiretta è stata valutata solo per *L. pneumophila* sierogruppo 1; la sensibilità e la specificità per altri sierogruppi o specie non sono note (Luck *et al.*, 2002; Muder, 2000). A causa della formazione di anticorpi cross-reattivi, circa il 50% dei pazienti infettati con *L. pneumophila* non-sierogruppo 1 manifesta una sieroconversione con antigeni specifici di *L. pneumophila* sierogruppo 1 (Edelstein, 2002). Un risultato negativo non esclude la diagnosi di legionellosi. Inoltre le preparazioni antigeniche differiscono nei diversi laboratori e tra le ditte produttrici di kit, e ciò produce diversi livelli anticorpali critici, pertanto per alcune preparazioni antigeniche la specificità potrebbe essere relativamente alta per un certo campione e bassa per un altro (Rose *et al.*, 2002). L'esistenza di reattività crociata tra Legionelle e altri microrganismi come ad esempio *Campylobacter* e *Pseudomonas* species (Marshall *et al.*, 1994; Boswell, 1996), e la difficoltà di distinguere tra infezione in atto o infezione pregressa in caso di campione singolo di siero o di titolo anticorpale costante, rende la conferma diagnostica più complessa .

I test di microagglutinazione ed ELISA sono test sierologici più specifici per *L. pneumophila* sierogruppo 1 (Edelstein, 2002). La microagglutinazione è un metodo rapido ed economico che permette di evidenziare anticorpi appartenenti essenzialmente alla classe IgM, per questo motivo, e per tutto quanto detto in merito alla risposta anticorpale è una tecnica scarsamente utilizzata nella diagnosi di legionellosi. Il metodo ELISA viene utilizzato sempre più frequentemente nei laboratori di diagnostica, a causa della diffusione di numerosi kit commerciali; la



concordanza tra il test ELISA e l'immunofluorescenza è del 91% circa (Edelstein, 2002). La sensibilità è tra l'80% e il 90% e la specificità è di circa il 98%.

L'evidenziazione di *Legionella* nei campioni clinici per mezzo dell'immunofluorescenza diretta (DFA), pur permettendo di confermare la diagnosi di polmonite da *Legionella* entro poche ore, ha una validità inferiore al metodo colturale. La tecnica si effettua in 2-3 ore circa, richiede una certa preparazione ed esperienza nella lettura del preparato ed è influenzata dalla specificità degli antisieri utilizzati e dalle dimensioni del preparato esaminato. La DFA effettuata su escreato può dare risultati positivi fino a 2-4 giorni dopo l'inizio della terapia antibiotica e spesso anche per periodi più lunghi in casi di polmonite cavitaria (Luck *et al.*, 2002). La DFA è un metodo efficace con campioni di espettorato, aspirati endotracheali e transtracheali e su biopsie polmonari (Stout *et al.*, 2003). Pazienti con legionellosi diagnosticata con coltura hanno una DFA positiva tra il 25% e il 70%, tuttavia la specificità del test è superiore al 99,9%. Pertanto un risultato negativo non esclude la diagnosi di legionellosi, ma un risultato positivo ha quasi sempre un valore diagnostico se la lettura del vetrino è stata fatta in modo corretto. Molta attenzione deve essere posta per prevenire i falsi positivi in DFA, quando i campioni sono stati a contatto con acqua o tamponi contaminati.

L'uso della coltura o dell'immunofluorescenza diretta è diminuito e la maggior parte dei casi di legionellosi è attualmente diagnosticata mediante rilevazione dell'antigene urinario. Come conseguenza di questo cambiamento la rilevazione di *Lp1* è aumentata e tutti gli altri sierogruppi o specie sono sotto-diagnosticati.

La diagnosi di legionellosi in campioni clinici mediante *Polymerase Chain Reaction* (reazione a catena della polimerasi o PCR) si basa sulla determinazione della presenza di DNA genomico di *Legionella*, attraverso

amplificazione di geni specifici (Cloud *et al.*, 2000; Murdoch, 2003). Le innovazioni tecnologiche hanno portato all'introduzione della Real-Time PCR che, rispetto alla PCR classica ha il vantaggio di visualizzare la reazione in tempo reale, dando anche informazioni sulla quantità di DNA presente nel campione. Per questo è molto spesso denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale (q-PCR). Negli ultimi dieci anni sono stati pubblicati numerosi articoli in cui sono descritti protocolli per la diagnosi di polmoniti causate da *Legionella*, *Chlamydia* e *Mycoplasma* mediante "multiplex real-time PCR", con cui si evidenzia simultaneamente il DNA dei tre microorganismi (McDonough *et al.*, 2005). La Real-Time PCR è stata applicata anche per la singola determinazione di infezione da *L. pneumophila* e/o *Legionella* species (Templeton *et al.*, 2003). Gli articoli pubblicati illustrano come la diagnosi mediante amplificazione di geni specifici sia vantaggiosa rispetto all'esame colturale perché richiede tempi di analisi di poche ore, avendo una sensibilità pari, se non superiore, rispetto all'esame colturale e utilizzando quantità minime di DNA genomico. La sensibilità della PCR dipende dal tipo di campione, essendo più elevata (> 99%) per analisi effettuate su campioni del tratto respiratorio (espettorato, broncoaspirato, broncolavaggio), mentre si riduce per campioni rappresentati da altri liquidi corporei (sieri o urine) (Aoki *et al.*, 2003; Murdoch, 2003; Diederer *et al.*, 2007). La specificità è data dal gene e/o dalla porzione di gene target scelto per l'amplificazione. I geni target più frequentemente analizzati sono: mip, 16S rDNA, 5S rDNA. I saggi di Real-Time PCR per la diagnosi di *Legionella* su campioni clinici rispetto alla PCR qualitativa hanno il vantaggio di ridurre il rischio di contaminazione del campione, minimizzare il tempo di analisi ed essere ancora più sensibili. Inoltre, rispetto ai metodi classici di identificazione, la Real-Time PCR permette il riconoscimento delle numerose specie ad oggi identificate e di tutti i sierogruppi della specie *L.pneumophila*. Tuttavia,

poiché non è ancora disponibile un protocollo di analisi standard, la Real-Time PCR non è un metodo validato per la diagnosi di *Legionella* e la sua positività può indicare solo un caso presunto.

Per quanto riguarda la ricerca di *Legionella* in campioni di provenienza ambientale a livello internazionale sono state redatte due norme (entrambe in fase di revisione) che descrivono la determinazione di *Legionella* in matrici ambientali: ISO 11731-1:1998 “*Water quality- detection and enumeration of Legionella*” e ISO 11731-2:2004 “*Water quality- detection and enumeration of Legionella*” Part 2: “*Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts*”. Le matrici ambientali che vengono generalmente utilizzate per la ricerca di *Legionella* in campioni ambientali sono: acqua, sedimenti, biofilm ed aria (preferibilmente umida).

La Real-Time PCR (q-PCR) è un metodo basato sulla amplificazione di geni specifici, che rispetto alla PCR classica o qualitativa, permette la quantificazione del DNA genomico presente nel campione, indipendentemente dallo stato vitale delle cellule. Mediante questo saggio, è possibile analizzare campioni d’acqua e ottenere risultati, espressi in unità genomiche /litro (UG/L), in poche ore con evidenti vantaggi per il controllo sulla contaminazione da *Legionella* e sulla tutela della salute pubblica. Tuttavia la Real Time PCR può essere utilizzata solo se in parallelo viene effettuato l’esame colturale, poiché il metodo non è stato ancora validato. Diversi studi sono stati condotti al fine di confrontare il metodo colturale con la Real-Time PCR che mostrano un più elevato numero di campioni positivi e valori più alti di quantificazione con la Real-Time PCR rispetto alla coltura (Behets *et al.*, 2007). Diverse ragioni sono state indicate per spiegare queste differenze tra cui le più importanti sono la rilevazione di DNA di batteri morti o danneggiati o di cellule vitali ma non coltivabili,

oppure di DNA di *Legionella* intra-amoeba. (Alleron *et al.*, 2008). L'Association Française de Normalisation (AFNOR) ha sviluppato uno standard (NF T90-471) per assicurare l'equivalenza dei risultati ottenuti da differenti q-PCR e alcuni kit commerciali sono stati messi a punto sulla base di tale norma. E' in corso inoltre la stesura di una nuova norma a cura della International Organization for Standardization (ISO) per cercare di standardizzare e validare questo metodo.

Ciò che maggiormente limita l'uso della PCR rispetto alla coltura è che nella legislazione nazionale, così come in quella europea e dell'OMS, i livelli di azione sono espressi in unità formanti colonia e non in unità genomiche e non esiste a tutt'oggi un consenso di come i risultati ottenuti da un metodo possano essere raffrontati con quelli ottenuti dall'altro. In uno studio multicentrico internazionale, recentemente pubblicato, è stato analizzato un numero elevato di campioni ambientali e i risultati ottenuti da analisi mediante qPCR e mediante coltura sono stati confrontati. L'elaborazione dei dati raccolti ha consentito la determinazione di livelli di allerta e/o di azione espressi come unità genomiche (tenendo conto anche dei diversi livelli di allerta e/o azione adottati nei diversi paesi partecipanti allo studio). Bisogna comunque considerare che i valori riportati sono strettamente legati al protocollo di PCR utilizzato come confronto. Poiché la q-PCR è effettivamente vantaggiosa per molteplici aspetti ma non ancora validata a livello internazionale, essa può, ad oggi, essere solo consigliata per una rapida analisi di numerosi campioni prelevati da siti probabilmente associati ad un caso o ancor più a un cluster di legionellosi, potendo in tempi brevi escludere i siti negativi ed identificare quelli positivi che dovranno essere comunque analizzati con il metodo colturale.

### 1.2.7 Terapia

La terapia dell'infezione sostenuta da *Legionella* si basa essenzialmente sul trattamento con antibiotici attivi verso il patogeno oltre alle usuali misure di supporto respiratorio o sistemico. I batteri appartenenti al genere *Legionella* sono microrganismi essenzialmente intracellulari. Di conseguenza, tutti gli agenti antimicrobici efficaci nel trattamento delle legionellosi debbono essere in grado di concentrarsi ed essere attivi a livello intracellulare (Horwitz, 1983). Inoltre, questi stessi farmaci devono essere in grado di distribuirsi e persistere adeguatamente nei tessuti infetti da *Legionella*. La Febbre di Pontiac ha una evoluzione benigna anche in assenza di specifico trattamento chemioterapico. Tutte le altre malattie sostenute da *Legionella* spp. dalle più comuni polmoniti, alle meno frequenti infezioni extrapolmonari, viceversa richiedono un trattamento specifico per ridurre la probabilità di un esito infausto.

Gli antibiotici che rispondono adeguatamente ai suddetti requisiti sono i chinoloni, i macrolidi e, con minor efficienza, le tetracicline. Al contrario, tutte le betattamine, i carbapenemi, gli aminoglicosidi ed il cloramfenicolo sono inutili per il trattamento delle legionellosi in quanto non raggiungono concentrazioni intracellulari in grado di esplicare un effetto antibatterico (Edelstein and Cianciotto, 2005).

Sulla base di numerosi studi condotti *in vitro* misurando la attività anti-*Legionella* (nella maggior parte dei casi *L. pneumophila* sierogruppo 1) in macrofagi alveolari polmonari di cavie e, meno frequentemente, in monociti umani o altre linee cellulari, i chinoloni (in particolare levofloxacina) sono risultati superiori ai macrolidi. Tra questi ultimi, azitromicina è apparsa superiore a claritromicina, ed entrambi questi due farmaci si sono dimostrati superiori alla eritromicina (Edelstein and Cianciotto, 2005; Pedro-Botet and Yu, 2006). Sul piano clinico non esistono studi prospettici randomizzati di paragone tra un macrolide ed un

chinolone o fra antibiotici appartenenti alla stessa classe di farmaci nel trattamento della polmonite da *Legionella*. Infatti gli unici dati disponibili in letteratura fanno riferimento a studi osservazionali. Tra questi quelli più validi in termini di numero di casi osservati sono tre, tutti pubblicati nel 2005 (Blazquez Garrido *et al.*, 2005; Mykietiuk *et al.*, 2005; Sabria *et al.*, 2005) : due sono retrospettivi ed uno prospettico. Visti nel loro complesso i dati cumulativi dei tre studi riguardarono 658 pazienti, di cui 221 trattati con un macrolide e 237 con un chinolone. I pazienti trattati con il chinolone ebbero una più rapida defervescenza (mediamente in 66 ore, contro 97 ore con il macrolide), una minore durata della degenza ospedaliera (mediamente 6,6 giorni, contro 9,0 con il macrolide) una minore incidenza di complicanze, quali ascesso-cavitazione polmonare, empiema pleurico, shock settico, necessità di supporto respiratorio con ventilazione meccanica (8,4% contro 18,5% con il macrolide) e una più bassa mortalità (2,1% contro 4,5% con il macrolide). Anche gli effetti collaterali indesiderati furono 12,5% con il chinolone contro 23,4% con il macrolide.

Nel considerare questi dati è importante tuttavia tener conto che, mentre tra i chinoloni il farmaco impiegato fu in tutti i casi, con solo 4 eccezioni, la levofloxacina, per i macrolidi furono impiegate due possibili opzioni: claritromicina, nella maggior parte dei casi, ed eritromicina (Blazquez Garrido *et al.*, 2005; Murdoch, 2003; Mykietiuk *et al.*, 2005; Sabria *et al.*, 2005). Giova ricordare che entrambi questi due macrolidi risultano meno efficaci di azitromicina nei confronti di *Legionella* in vari modelli di attività intracellulare; inoltre proprio azitromicina, unico dei macrolidi, ha dimostrato in alcuni esperimenti *in vitro* la stessa efficienza anti-*Legionella* dei chinoloni (Pedro-Botet and Yu, 2006). Pertanto sul piano clinico non vi è al momento evidenza della superiorità dei chinoloni, ed in particolare di levofloxacina, su azitromicina nel trattamento delle legionellosi.

A far propendere l'ago della bilancia leggermente a favore della levofloxacin sono una serie di considerazioni. Innanzitutto esiste una vasta esperienza con questo farmaco, che è superiore rispetto a tutti gli altri farmaci anti-*Legionella*. Un dato estremamente impressionante fu lo 0% in termini di mortalità che fu registrato nei sei studi clinici condotti per la approvazione del farmaco da parte della Food and Drug Administration (Yu *et al.*, 2004). Infine, il più ampio spettro antimicrobico (esteso ai ceppi penicillina-macrolide resistenti di *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* meticillina sensibile, *Pseudomonas aeruginosa* e le enterobacteriaceae, che possono co-infettare pazienti resi immunodeficienti dalla stessa malattia da *Legionella*) di levofloxacin rispetto a tutti gli altri antibiotici anti-*Legionella* (Edelstein and Cianciotto, 2005). Azitromicina rappresenta comunque una prima scelta nella terapia della legionellosi. Sotto trattamento nelle polmoniti non complicate si consta un miglioramento dopo 3-5 giorni di terapia. La durata del trattamento va dai 10 ai 21 giorni (21 in caso di immunodepressione).

Gli accessi polmonari, empiemi pleurici, endocarditi o altre infezioni extrapolmonari possono richiedere trattamenti assai prolungati, secondo il giudizio del clinico infettivologo. Va sottolineato che le polmoniti da *Legionella* comportano alterazioni radiologiche che regrediscono assai lentamente, a volte solo dopo cinque-sei mesi, così come una antigenuria che può persistere positiva per mesi (Edelstein and Cianciotto, 2005). Per questo motivo tali esami non vanno considerati per modificare la durata “standard” delle varie terapie antibiotiche.

### **1.2.8 Aspetti epidemiologici**

Le infezioni da *Legionella* spp sono considerate un problema emergente in Sanità Pubblica, tanto che sono sottoposte a sorveglianza speciale da parte dell' Organizzazione Mondiale della Sanità, della Comunità Europea prima

da parte dell'European Working Group for Legionella Infections - EWGLI poi dal 2010 da parte dell'European Legionnaires' Disease Surveillance Network - ELDSNet) e dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), che ha istituito dal 1983 il Registro Nazionale della Legionellosi. Dal recente studio epidemiologico pubblicato dal Gruppo multicentrico di studio sulla legionellosi in Italia sulla prevalenza di anticorpi anti-*Legionella* nella popolazione generale e in lavoratori ospedalieri (medici, dentisti) frequentemente esposti ad acque potenzialmente contaminate è emerso che la sieropositività per *Legionella* non sembra conseguente al superamento della patologia, ma piuttosto l'espressione della frequente esposizione al microrganismo negli ambienti di vita e di lavoro.

Attualmente in Italia le infezioni derivano prevalentemente dalla contaminazione dei sistemi di distribuzione dell'acqua e la legionellosi è soggetta a obbligo di notifica nella classe II (DM 15 dicembre 1990), ma dal 1983 è anche soggetta a un sistema di segnalazione che raccoglie informazioni dettagliate in un apposito registro nazionale, che ha sede presso l'Istituto Superiore della Sanità. Nonostante questo, secondo il Centro nazionale di Epidemiologia e il dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate dell'ISS, che annualmente producono un rapporto sull'incidenza della malattia nel nostro Paese, il numero di casi è sottostimato sia per un mancato invio delle schede di segnalazione da parte dei sistemi sanitari locali che per una mancata diagnosi.

Nel 2009 sono pervenute all'ISS 1.200 schede di sorveglianza relative ad altrettanti casi di legionellosi, di cui 1.146 confermati e 54 presunti, senza sostanziali variazioni rispetto al 2008. L'80% circa dei casi è stato notificato da 6 regioni (Lombardia, Piemonte, Veneto, Emilia - Romagna, Toscana e Lazio), il rimanente 20% da 14 Regioni e Province Autonome, una sola regione (Basilicata) non ha notificato alcun caso. Rispetto al 2008 in Toscana, in Emilia-Romagna, in Calabria e nella Provincia Autonoma di



Bolzano si è registrato un lieve incremento nel numero dei casi segnalati, mentre in Friuli-Venezia Giulia, Umbria e Basilicata si è registrata una discreta diminuzione. Sia per quanto riguarda la diminuzione dei casi che per l'aumento degli stessi, rimane da chiarire se ciò può essere attribuibile rispettivamente a un'aumentata sorveglianza ambientale o a una maggiore sensibilizzazione nella notifica di questa malattia.

Dei 1.200 casi notificati, 110 (9,2%) erano stati ricoverati in ospedale o in clinica, 178 casi (14,7%) avevano pernottato almeno una notte in luoghi diversi dall'abitazione abituale (alberghi, campeggi, navi, abitazioni private), 33 casi (2,8%) erano residenti in comunità chiuse, 33 casi (2,8%) avevano frequentato piscine e 13 casi (1,1%) avevano effettuato cure odontoiatriche nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi. Un importante aumento rispetto al 2008 hanno avuto i casi nosocomiali con un 40% in più di cluster (25 nel 2009 contro i 15 del 2008). Elevata, inoltre, rimane la letalità delle infezioni acquisite in ospedale (34% contro il 12% della letalità dei casi comunitari) che impone una maggiore attenzione ai programmi di valutazione, minimizzazione e gestione del rischio da *Legionella* nelle strutture sanitarie.

Nel 2009 sono stati notificati all'ISS 281 casi di legionellosi associata ai viaggi. I casi in turisti italiani sono stati complessivamente 178, di cui l'86% avevano soggiornato in albergo, il 5,6% in campeggio e il restante 8,4% presso altre strutture. La maggioranza dei turisti italiani ha viaggiato in Italia e solo nel 10% dei casi la meta del viaggio è stata una località straniera. I casi di legionellosi verificatisi in turisti stranieri che hanno visitato l'Italia e notificati all'ISS dall'EWGLINET sono stati complessivamente 103. Nel 2009 sono stati notificati dallo EWGLINET 40 cluster associati con altrettante strutture recettive italiane che hanno coinvolto in totale 50 turisti. Sedici strutture erano già state associate con casi di legionellosi nei due anni precedenti. Il numero di casi di legionellosi

associata ai viaggi è rimasto pressoché invariato rispetto al 2008, tuttavia è molto preoccupante l'elevato numero di cluster notificati nel 2009, che fa sì che l'Italia si collochi al primo posto fra i Paesi europei per numero di cluster associati al soggiorno presso strutture recettive. Questo dato dovrebbe suggerire agli operatori del settore di mettere in atto o di migliorare le misure preventive per contenere la contaminazione ambientale da *Legionella* come suggerito dalle linee guida per i gestori delle strutture turistico-recettive.

L'incidenza della legionellosi rimane comunque ancora sottostimata nel nostro Paese, soprattutto nelle Regioni del Sud, dove l'incidenza media della legionellosi è pari a un quarto della media nazionale (5 casi/1.000.000 nel Sud, vs 20 casi/1.000.000 a livello nazionale).

Nel 2010 sono pervenute all'ISS 1.234 schede di sorveglianza relative ad altrettanti casi di legionellosi, di cui 1.184 confermati e 50 presunti, senza sostanziali variazioni rispetto al 2009.

Il 76% circa dei casi è stato notificato da 6 regioni (Lombardia, Piemonte, Veneto, Emilia - Romagna, Toscana e Lazio), il rimanente 24% da 14 Regioni e Province Autonome, una sola regione (Molise) non ha notificato alcun caso. L'incidenza della legionellosi in Italia nel 2010 è stata pari a 20 casi per milione di popolazione, con valori significativamente più elevati nelle Regioni del Nord (31,2 casi/1.000.000 abitanti) rispetto a quelle del Sud (6 casi/1.000.000), mentre al Centro il valore si avvicina alla media europea (20,6 casi/1.000.000). Un caso particolare è rappresentato dalla provincia Autonoma di Trento, nella quale l'incidenza della legionellosi è particolarmente elevata ed in costante aumento dal 2006; nel 2010 l'incidenza ha raggiunto i 97 casi per milione di abitanti (considerando sia i casi comunitari che nosocomiali), probabilmente per la presenza di ceppi particolarmente virulenti o per l'elevata efficienza nella sorveglianza e nella diagnosi della malattia in questa area.

Dei 1.234 casi notificati, 65 (5,3%) erano stati ricoverati in ospedale, 129 casi (10,5%) avevano pernottato almeno una notte in luoghi diversi dall'abitazione abituale (alberghi, campeggi, navi, abitazioni private), 42 casi (3,4%) erano residenti in comunità chiuse, 18 casi (1,5%) avevano frequentato piscine e 6 casi (0,5%) avevano effettuato cure odontoiatriche nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi. I casi nosocomiali hanno avuto un notevole decremento, passando da 110 nel 2009 a 65 nel 2010. Tuttavia la letalità dei casi acquisiti in ospedale è risultata superiore al 53% (34% del 2009) contro il 13% dei casi comunitari.

Nel 2010 sono stati notificati all'ISS 232 casi di legionellosi associata ai viaggi. I casi in turisti italiani sono stati complessivamente 129, di cui il 93% avevano soggiornato in albergo, il 4% in campeggio e il restante 3% presso altre strutture. La maggioranza dei turisti italiani ha viaggiato in Italia e solo nel 10% dei casi la meta del viaggio è stata una località straniera. I casi di legionellosi verificatisi in turisti stranieri che hanno visitato l'Italia e notificati all'ISS dall'ELDSNet sono stati complessivamente 103. Nel 2010 sono stati notificati 33 cluster associati con altrettante strutture recettive italiane che hanno coinvolto in totale 50 turisti. Undici strutture erano già state associate con casi di legionellosi nei due anni precedenti. Il numero di casi di legionellosi associata ai viaggi è leggermente diminuito rispetto al 2009, passando da 281 a 232 casi (-17,4%). Anche il numero di cluster associati con strutture recettive è diminuito, così come il numero di strutture già associate con casi di legionellosi.

Nel 2011 sono pervenute all'ISS 1008 schede di sorveglianza relative ad altrettanti casi di legionellosi, di cui 979 confermati e 29 presunti, in calo rispetto al 2010. Il 74,4% circa dei casi è stato notificato da 6 regioni (Lombardia, Piemonte, Veneto, Emilia - Romagna, Toscana e Lazio), il rimanente 26,6% da 15 Regioni e Province Autonome. L'incidenza della

legionellosi in Italia nel 2011 è stata pari a 16,6 casi per milione di popolazione, con valori significativamente più elevati nelle Regioni del Nord (25,1 casi/1.000.000 abitanti) rispetto a quelle del Sud e Isole (5,5casi/1.000.000), e a quelle del Centro (16,6 casi/1.000.000).

Dei 1.008 casi notificati, 65 (6,4%) erano stati ricoverati in ospedale, 137 casi (13,6%) avevano pernottato almeno una notte in luoghi diversi dall'abitazione abituale (alberghi, campeggi, navi, abitazioni private), 28 casi (2,8%) erano residenti in comunità chiuse, 2 casi (0,2%) avevano frequentato piscine e 5 casi (0,5%) avevano effettuato cure odontoiatriche nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi. Il numero di casi nosocomiali è rimasto stabile rispetto al 2010 (65 casi) ed in netta diminuzione (-41%) rispetto ai 110 casi del 2009 a 65. Tuttavia la letalità dei casi acquisiti in ospedale è risultata superiore al 58% (53% nel 2010) contro il 14,4% dei casi comunitari, e questo dato evidenzia l'importanza di adottare negli ospedali le migliori misure di prevenzione e controllo disponibili per ridurre al minimo il rischio di malattia. Nel 2011 sono stati notificati all'ISS 249 casi di legionellosi associata ai viaggi. I casi in turisti italiani sono stati complessivamente 137, di cui il 91% aveva soggiornato in albergo, il 6% in campeggio e il restante 3% presso altre strutture .La maggioranza dei turisti italiani ha viaggiato in Italia e solo nel 6% la meta del viaggio è stata una località straniera. I casi di legionellosi verificatesi in turisti stranieri che hanno visitato l'Italia e notificati all'ISS dall'ELDSNet sono stati complessivamente 112. Nel 2011 sono stati notificati 46 cluster associati con altrettante strutture recettive italiane che hanno coinvolto in totale 82 turisti. Quattordici strutture erano già state associate con casi di legionellosi nei due anni precedenti. Sia i casi di legionellosi associata ai viaggi che quello dei cluster associati a strutture recettive è aumentato rispetto al 2009.

L'analisi molecolare dei ceppi di *Legionella*, isolati dall'uomo a seguito di infezioni avvenute in Italia tra il 1987 e il 2011, effettuata dal laboratorio di riferimento nazionale, ha mostrato, in accordo con quanto riportato a livello internazionale, che la specie di *Legionella* che causa il maggior numero di casi di malattia in Italia è *L. pneumophila* sierogruppo 1, seguita dai sierogruppi 6, 2, 3.

In circa il 60% dei casi non si riesce a risalire alla fonte di infezione ambientale, e questo è presumibilmente dovuto alle molteplici occasioni di esposizione.

Da uno studio condotto a livello nazionale sulla diffusione di *Legionella* spp nell'acqua calda delle abitazioni (Gruppo multicentrico di studio sulla legionellosi in Italia), è emerso che il 22,6% delle case era colonizzato da *Legionella*, con concentrazioni maggiori/uguali a 1.000 UFC/L nel 54,6% dei casi, e che la specie più diffusa era *L. pneumophila* (oltre l'80% dei campioni esaminati). Lo studio dei fattori di rischio ha evidenziato che risiedere ai piani elevati di un condominio di grandi dimensioni, con un sistema di riscaldamento centralizzato e realizzato da più di dieci anni costituisce un rischio significativo per la colonizzazione.

Da un'indagine analoga condotta negli alberghi, è emerso che il 75% delle strutture esaminate presentava una contaminazione da *Legionella* nell'acqua calda sanitaria, con frequente presenza di *L. pneumophila* sierogruppo 1, ossia del sierogruppo maggiormente associato con la comparsa di malattia. Il principale fattore di rischio per la contaminazione degli alberghi è rappresentato dalla vetustà dell'edificio, mentre la temperatura dell'acqua >60°C alla produzione e >55°C ai rubinetti svolge un'azione protettiva. Inoltre, un eccesso di cloro libero residuo e un'acqua troppo dolce sembrano favorire la presenza di *L. pneumophila* sierogruppo 1. Va sottolineato che non è stato dimostrato un maggior rischio di malattia in coloro che abitano in ambienti contaminati, quindi la malattia rimane un

evento molto raro, soprattutto tra le persone sane.

In letteratura sono riportati diversi casi di infezione in neonati (a causa della presenza di *Legionella* nell'acqua della vasca dove è avvenuto il parto) e in pazienti con ferite chirurgiche (a causa di aspirazione, instillazione e/o aerosolizzazione di acqua contaminata durante la terapia respiratoria).

Nonostante i numerosi siti di potenziale infezione, i casi segnalati restano relativamente limitati, in parte perché misconosciuti ed in parte perché non sono ancora del tutto chiari i meccanismi di protezione degli esposti.

In Europa nel periodo 1993-2006 sono stati notificati in totale 42.627 casi di Malattia dei Legionari, e di questi quasi 12.000 si sono verificati nel biennio 2005-2006, con 5.700 casi nel 2005 e 6.280 nel 2006. Questo aumento è in parte attribuibile al fatto che un numero sempre maggiore di paesi ha introdotto a livello nazionale programmi di sorveglianza per la prevenzione ed il controllo della legionellosi. Infatti il numero di paesi che hanno inviato i dati all'EWGLI è passato da 19 nel 1993 a 34 nel 2003 e 35 dal 2004 fino al 2006, con l'inserimento di Andorra. Il tasso medio di infezione è risultato pari a 10,3 casi per milione di abitanti nel 2005 (sulla base di una popolazione totale di 551 milioni) e a 11,2 casi per milione di abitanti nel 2006 (sulla base di una popolazione totale di 563 milioni); in entrambi gli anni i tassi più alti sono stati riportati dalla Spagna (28,4/1.000.000 nel 2005 e 30,0/1.000.000 nel 2006), seguita nel 2005 dalla Francia (24,8/1.000.000) e nel 2006 dall'Olanda (26,9/1.000.000). Si ritiene tuttavia che la frequenza della malattia sia ancora largamente sottostimata e che l'incidenza più probabile in Europa sia superiore ai 20 casi per milione di abitanti. Nel biennio 2005-2006 sono stati riportati 629 (5,3%) casi nosocomiali, 7.041 (58,8%) comunitari, 2.622 (21,8%) associati ai viaggi e 1.688 (14,1%) che non è stato possibile classificare. Inoltre sono state individuate 214 epidemie che hanno coinvolto in totale 1.028 persone: 19 erano nosocomiali, 44 comunitarie, 143 associate ai viaggi e 8 di origine

sconosciuta. Le torri di raffreddamento sono state indicate come sorgenti di infezione in 19 epidemie comunitarie, gli impianti idrici sono risultati responsabili di 15 epidemie nosocomiali, 5 comunitarie e 52 associate ai viaggi, le vasche idromassaggio di 4 epidemie comunitarie e 3 associate ai viaggi.

Nel biennio 2007-2008 sono stati segnalati in totale 11.867 casi: 5.907 sono stati segnalati nel 2007 da 33 paesi e 5.960 nel 2008 da 34 paesi (incluso Cipro, che partecipava per la prima volta). I due paesi con la maggior differenza nel numero di casi tra il 2007 e il 2008 sono stati la Russia (con 140 casi nel 2007 a causa di una grossa epidemia e "solo" 18 casi nel 2008) e l'Italia (851 casi nel 2007 e 1.107 casi nel 2008). Il tasso di incidenza per milione di abitanti è risultato pari a 11,3 nel 2007 (sulla base di una popolazione totale di 523 milioni) e a 11,8 nel 2008 (sulla base di una popolazione totale di 506 milioni). Nel biennio 2007-2008 sono stati riportati 748 (6,3%) casi nosocomiali, 7.328 (61,8%) comunitari, 2.510 (21,2%) associati ai viaggi e 1.281 (10,8%) che non è stato possibile classificare. Inoltre sono state individuate 243 epidemie che hanno coinvolto in totale 890 persone: 28 erano nosocomiali, 63 comunitarie, 150 associate ai viaggi e 2 di origine sconosciuta.

Nel 2009 sono stati riportati allo EWGLINET 818 casi di Malattia dei legionari associati ai viaggi, a fronte di 870 casi nel 2008 e 947 nel 2007. Questo decremento in parte riflette il calo del numero di viaggiatori e l'impatto della recessione globale sul turismo, ma anche la maggior attenzione al controllo della contaminazione e alla prevenzione dell'infezione nelle strutture turistiche può aver contribuito a ridurre il numero di casi. I paesi che hanno segnalato più casi sono stati Regno Unito (n=173), Italia (n=169), Francia (n=163) e Paesi Bassi (n=109). L'Italia è risultata anche il paese in cui si sono verificati più casi (n=209), seguita da Francia (n=135), Spagna (n=92) e Turchia (n=45). Anche il numero di

clusters è diminuito da 92 nel 2008 a 75 nel 2009. I paesi associati al maggior numero di clusters sono stati Italia (n=26), Francia (n=16), Turchia (n=10) e Spagna (n=9). Il cluster più grande si è verificato in Italia ed ha interessato sette casi. Da aprile 2010 l'EWGLINET è finanziato e coordinato dall'European Centre for Disease prevention and Control (ECDC) ed è stato rinominato ELDSNet (European Legionnaires' Disease Surveillance Network). Fanno parte dell'ELDSNet 27 paesi della Comunità Europea, Islanda e Norvegia.



## **Cap.2- INDAGINE EPIDEMIOLOGICA E SORVEGLIANZA**

### **2.1 Indagine epidemiologica**

L'indagine epidemiologica ha l'obiettivo di identificare la possibile fonte di infezione, la presenza di altri casi correlati alla stessa fonte di infezione e l'esistenza di altri soggetti esposti allo stesso rischio per attuare adeguate misure di controllo del rischio e della contaminazione.

A seguito della segnalazione di un caso di legionellosi anche solo sospetto è compito dei servizi territoriali effettuare l'inchiesta epidemiologica finalizzata a stabilire se il caso è collegato a un viaggio e quindi alla permanenza in strutture turistico-recettive, se ha origine nosocomiale o lavorativa, oppure se la malattia è associata al proprio domicilio.

Inoltre devono essere raccolte tutte le informazioni previste per la compilazione della scheda di sorveglianza.

Tranne che in caso di legionellosi nosocomiale o associata a cure termali o al soggiorno presso strutture recettive in cui gli stabilimenti interessati devono immediatamente effettuare un'indagine ambientale con prelievo di campioni, l'indagine in presenza di un caso isolato, non necessita, in genere, di essere corredata da prelievi ambientali sistematici al domicilio del malato a causa della molteplicità delle fonti potenziali e dell'ampia diffusione di *Legionella* nell'ambiente. La decisione di effettuare l'indagine è lasciata al competente servizio territoriale che deve valutare di volta in volta l'opportunità di effettuare o meno dei campionamenti ambientali, sulla base della valutazione del rischio.

L'approfondimento delle indagini dipende dal contesto e dal numero di casi (casi sporadici, focolai, cluster). Per avere un quadro globale della situazione è fondamentale disporre per ciascun paziente affetto da

legionellosi di informazioni precise su una eventuale esposizione a rischio nelle due settimane precedenti l'insorgenza dei sintomi.

L'anamnesi deve approfondire almeno i punti seguenti:

- professione, contatto con acqua nebulizzata
- soggiorno in ambienti climatizzati
- bagni termali, piscine, idromassaggi
- luogo di soggiorno: ospedale, alberghi, casa, casa di cura
- terapia respiratoria, trattamenti odontoiatrici
- partecipazioni a crociere, fiere, esposizioni

### **Notifica dei casi.**

Data la pericolosità della malattia, nella maggior parte dei Paesi europei, i casi di legionellosi devono essere notificati alle competenti Autorità Sanitarie. In Italia, è prevista la notifica obbligatoria in classe II del D.M. 15/12/90. Il medico segnalatore deve comunicare il caso, entro 48 ore, al Servizio di Igiene e Sanità Pubblica dell'Azienda USL il quale procede all'invio del modello 15 alla Regione.

La Regione provvederà all'invio della notifica individuale al Ministero della Sanità ed all' ISTAT.

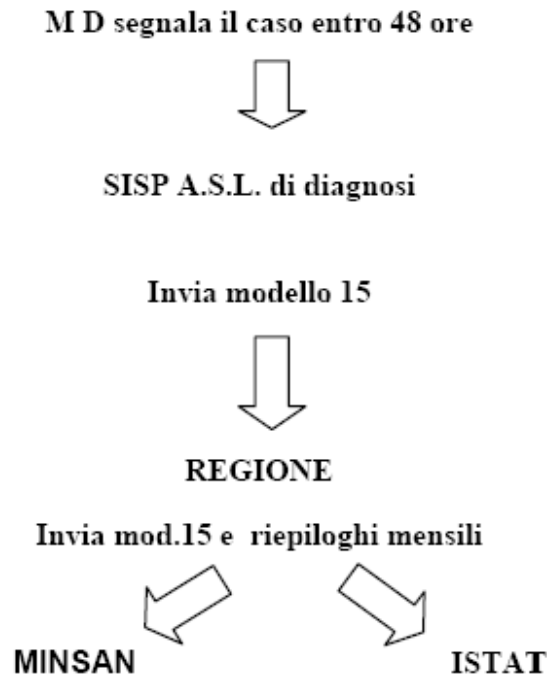
Ogni anno, i dati relativi ai casi notificati sono pubblicati sul Bollettino Epidemiologico del Ministero della Sanità, ripartiti per regione, provincia e sesso.

L'invio della notifica con il modello 15, classe II, non sostituisce l'invio della scheda di sorveglianza secondo quanto previsto dalla Circolare 400.2/9/5708 del 29/12/93.

E' prevista, inoltre, la notifica obbligatoria dei focolai di legionellosi in classe IV. Il medico segnalatore deve comunicare il focolaio entro 24 ore al SISP della ASL di diagnosi, il quale provvede all'invio del modello 15, classe IV (come da nota 400.2/26N/3749 del 31 luglio 1991), alla

Regione, al Ministero della Sanità, all'Istituto Superiore di Sanità ed all'ISTAT.

**Flusso di notifica dei casi di legionellosi (D:M: 15/12/90)**



## **2.2 La sorveglianza della legionellosi**

La legionellosi in Italia è una malattia sottoposta a notifica obbligatoria di malattia infettiva (ex DM 15/12/90) e a sorveglianza speciale. Negli ultimi dieci anni, questi sistemi di sorveglianza hanno fatto registrare un costante aumento del numero di casi, passando dai 325 casi notificati nel 2001 ai 1008 casi nel 2010.

I principali obiettivi della sorveglianza della legionellosi sono:

- monitorare la frequenza di legionellosi sia dal punto epidemiologico che clinico-nosologico, con particolare attenzione ai fattori di rischio per

l'acquisizione della malattia;

- identificare eventuali variazioni nell'andamento della malattia;
- identificare cluster epidemici di legionellosi dovuti a particolari condizioni ambientali al fine di evidenziare i fattori di rischio ed interrompere la catena di trasmissione.

## **Definizioni**

### Definizione di caso

Poiché non vi sono sintomi o segni o combinazioni di sintomi specifici della legionellosi, la diagnosi deve essere confermata dalle prove di laboratorio.

### Caso accertato

Infezione acuta delle basse vie respiratorie con segni di polmonite focale rilevabili all'esame clinico e/o esame radiologico suggestivo di interessamento polmonare, accompagnati da uno o più dei seguenti eventi:

(1) isolamento di *Legionella* spp. da materiale organico (secrezioni respiratorie, broncolavaggio, tessuto polmonare, essudato pleurico, essudato pericardico, sangue);

(2) aumento di almeno 4 volte del titolo anticorpale specifico verso *L. pneumophila* sierogruppo 1, rilevato sierologicamente mediante immunofluorescenza o microagglutinazione tra due sieri prelevati a distanza di almeno 10 giorni.

(3) riconoscimento dell'antigene specifico solubile nelle urine.

### Caso presunto

Infezione acuta delle basse vie respiratorie con segni di polmonite focale rilevabili all'esame clinico e/o esame radiologico suggestivo di interessamento polmonare, accompagnati da uno o più dei seguenti eventi:

(1) aumento di almeno 4 volte del titolo anticorpale specifico, relativo a sierogruppi o specie diverse da *L. pneumophila* sierogruppo 1;

- (2) positività all'immunofluorescenza diretta con anticorpi monoclonali o policlonali di materiale patologico;
- (3) singolo titolo anticorpale elevato ( $\Rightarrow$ 1:256) verso *L. pneumophila* sierogruppo 1.

#### Focolaio epidemico

Qualora due o più casi siano riscontrati come riconducibili ad una medesima esposizione nell'arco di sei mesi.

#### **Sistema di sorveglianza nazionale**

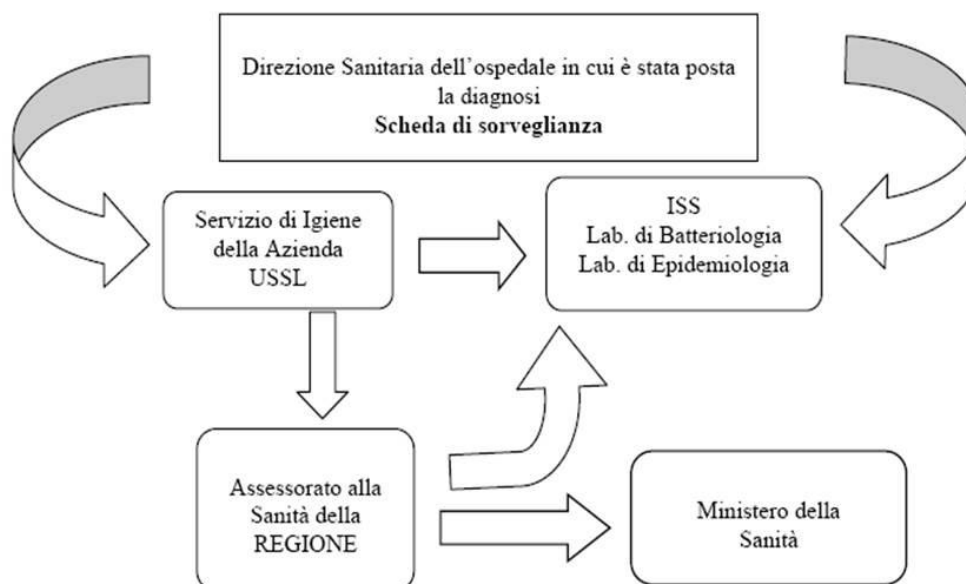
La scheda di sorveglianza deve essere compilata e tempestivamente mandata dal medico che ha fatto la diagnosi (Circolare 400.2/9/5708 del 29/12/93) al SISP dell'Azienda USSSL ed all'ISS. Devono essere inviati al Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica dell'ISS i ceppi clinici sospetti di *Legionella* eventualmente isolati, per la tipizzazione o la conferma.

Il SISP dell'Azienda USSSL di diagnosi mensile, provvede alla trasmissione mensile delle schede alla Regione, facendo riferimento all'indagine epidemiologica. L'invio della scheda di sorveglianza non sostituisce l'obbligo di notifica secondo quanto disposto dal D.M. 15/12/90.

Al fine di poter attuare tutti gli interventi preventivi necessari, il successivo invio della scheda da parte della Regione all'ISS è previsto quale completamento delle informazioni che non è stato possibile registrare all'inizio dell'evento.

## Flusso informativo delle schede di sorveglianza della legionellosi

(Circolare 400.2/9/5708 del 29/12/93)



Ai fini di una efficace sorveglianza sul territorio nazionale, è prevista la costruzione di una rete di Laboratori di Riferimento individuati dalle Regioni, collegati organicamente al Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica dell'ISS, sulla base delle competenze nel settore e dopo il completamento di un programma di controllo di qualità coordinato dall'ISS stesso.

### **2.2.1 Sorveglianza internazionale della legionellosi nei viaggiatori**

Parallelamente ai sistemi di sorveglianza nazionali, esiste un programma di sorveglianza internazionale (European Legionnaires Disease Surveillance Network, ELDSnet) che raccoglie informazioni relative ai casi di malattia dei legionari associati ai viaggi che si verificano nei cittadini dei 29 Paesi

che partecipano al programma. In ciascuno di questi Paesi è stato individuato un centro di collaborazione che per l'Italia è l'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

L'ISS comunica a ELDSnet le informazioni relative ai casi di legionellosi acquisita da cittadini italiani durante viaggi in Italia o all'estero e/o da cittadini stranieri che hanno soggiornato in Italia e che hanno presentato sintomi prima del rientro in patria, mentre ELDSnet comunica all'ISS le informazioni relative ai turisti stranieri che hanno soggiornato in Italia e hanno manifestato i sintomi di malattia una volta rientrati nel loro Paese. Negli ultimi anni, si è registrato un aumento anche dei casi di legionellosi associata ai viaggi, per lo più attribuibile a un miglioramento della diagnosi, con un numero sempre crescente di strutture recettive coinvolte, soprattutto durante il periodo estivo, quando frequentemente vengono segnalati cluster di casi.

# **Cap. 3 - LINEE-GUIDA, RACCOMANDAZIONI E MISURE DI CONTROLLO PER CONTENERE IL RISCHIO LEGIONELLA**

## **3.1 Linee-Guida nei Paesi europei e nel mondo**

Le prime linee-guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi sono state emanate nel 1991 parallelamente in Inghilterra e in America. Successivamente sono state numerose le proposte formulate da parte dei vari Paesi in tutto il mondo. In generale si può affermare che a tutt'oggi i provvedimenti emanati concordino nell'attribuire validità ad una serie di interventi per prevenire e ridurre la contaminazione da *Legionella* spp. all'interno delle reti idriche ospedaliere e non. Sussistono a questo proposito solo modeste differenze da Paese a Paese, soprattutto per quanto riguarda l'applicazione tecnica di questi metodi. Dall'OMS viene indicata l'opportunità di avvalersi di un approccio integrato per raggiungere gli obiettivi in termini di riduzione e abbattimento della contaminazione, utilizzando più strategie al contempo.

Le linee guida di *Allegheny County Health Department* fanno riferimento ad uno studio condotto dal gruppo di Pittsburgh nel quale viene messa in evidenza una relazione statisticamente significativa tra la percentuale di campioni ambientali risultati positivi alla ricerca di *Legionella* ed il rischio di legionellosi. Il valore soglia è indicato nel 30% di positività; al di sopra di questo valore il rischio per gli esposti diviene sostanziale ed è importante che siano messi in opera provvedimenti di controllo (disinfezione). Come si può vedere viene proposto un diverso approccio a seconda che si siano o meno verificati casi di legionellosi, e viene parimenti sottolineata l'importanza di una stretta sorveglianza clinica soprattutto in presenza di



una contaminazione “significativa”. In queste linee-guida non viene identificata una relazione tra il rischio e la carica microbica rilevata nell’acqua al punto d’uso. Questo tipo di approccio è l’unico che prevede la valutazione della percentuale di siti distali positivi. La verifica della positività deve essere condotta su prelievi provenienti da aree a rischio.

A differenza dell’approccio precedente nella maggior parte delle linee-guida emanate da altri paesi, soprattutto europei, si legge come il rischio di infezione sia intimamente correlato a: la carica microbica cui si viene esposti e le condizioni di efficienza dell’apparato immunitario.

Pertanto, secondo tali approcci, è opportuno fare costantemente una valutazione comparativa di entrambi questi fattori. Nella maggior parte delle linee guida sono stati proposti:

valori guida della contaminazione da *L. pneumophila* nell’acqua calda sanitaria, ovvero i livelli da ottenere; valori di allerta ai quali è opportuno rafforzare la sorveglianza clinica e mettere in atto interventi correttivi che possono essere diversi a seconda del Paese ma che in genere prevedono manutenzione del sistema e adozione di misure di controllo; valori massimi ai quali la contaminazione è ritenuta importante.

Anche in questo caso possono esserci alcune differenze nei provvedimenti da intraprendere, ma in linea di massima viene ritenuto indispensabile procedere ad una bonifica del sistema previo divieto di utilizzo dell’acqua calda fino alla negativizzazione dei campioni e rinforzare sia la sorveglianza clinica sia la sorveglianza ambientale, con programmazione di controlli seriatî ravvicinati nel tempo.

Secondo le raccomandazioni dell’OMS l’acqua calda sanitaria nelle aree ad alto rischio deve essere priva di contaminazione da *Legionella*, e si specifica come per ottenere questo risultato sia indicato ricorrere ad un approccio integrato che preveda l’utilizzo contemporaneo anche di più misure di controllo, quando necessario, con specifico riferimento all’uso dei

filtri da 0,2 µm nei reparti ad alto rischio. Si legge in tali raccomandazioni come uno degli approcci più validi sia quello proposto in Francia. In questo Paese sono stati proposti i seguenti valori come limite delle concentrazioni di *Legionella* nell'acqua calda ospedaliera: per i pazienti a rischio basso-intermedio (anziani, tabagisti, alcolisti, ecc.) il valore guida è stato individuato in  $<10^3$  UFC/L *L. pneumophila*, il valore di allerta in  $> 10^3$  UFC/L, il valore massimo in  $10^4$  UFC/L. Per i pazienti ad alto rischio (in condizione di immunosoppressione severa come per trapianti o terapia corticosteroidica prolungata) sono stati individuati valori guida della contaminazione in  $<50$  UFC/L, con livelli di allerta a 50 UFC/L e un livello massimo a 250 UFC/L.

Nelle linee-guida italiane viene proposta una differenziazione a seconda che si siano o meno verificati dei casi nella struttura in questione. A livelli di contaminazione  $\leq 10^2$  UFC/L in assenza di casi non viene indicato alcun trattamento. A valori  $10^3$ -  $10^4$  UFC/L si ritiene vi sia contaminazione in atto: dunque, in assenza di casi è opportuno che sia aumentata la sorveglianza clinica, soprattutto per i pazienti a rischio per i quali è controindicata l'esposizione a situazioni a rischio (docce etc.). In presenza invece di uno o più casi viene indicata la necessità di procedere a misure di bonifica e di controllo della colonizzazione da *Legionella* spp. I valori massimi sono individuati in  $10^4$  UFC/L.

Nelle linee-guida di OSHA (*Occupational Safety and Health Administration*, US) i valori guida proposti sono di  $\leq 10^4$  UFC/L, con valori di allerta di  $10^5$  UFC/L e valori massimi di  $10^6$ .

Nelle linee-guida svizzere i valori guida sono individuati in assenza di casi in  $<10^3$  UFC/L, i valori di allerta in  $10^3$ -  $10^4$  UFC/L, i valori massimi in  $\geq 10^4$  UFC/L. Laddove si verifici un caso di legionellosi nosocomiale viene indicata la necessità di ricorrere alla bonifica ambientale per qualunque

livello di colonizzazione. Nei reparti ad alto rischio invece la contaminazione deve essere nulla ( $<10^2$  UFC/L).

Esiste dibattito circa l'opportunità di effettuare una sorveglianza ambientale in strutture nelle quali non si sia mai verificato alcun caso di legionellosi nosocomiale (dunque nell'ambito di una prevenzione primaria). Invece esiste consenso nell'effettuarla laddove si siano presentati dei casi (prevenzione secondaria). Per quanto riguarda l'opportunità di effettuare una prevenzione primaria, quindi l'adozione di una strategia *proattiva* di controllo del rischio, i due approcci contrastanti sono esemplificati dalle linee-guida di *Allegheny County Health Department* e da quelle proposte da Centers for Disease Control and Prevention (CDC, US).

Nelle linee-guida di *Allegheny County Health Department* si legge come sia indicata per ogni ospedale una sorveglianza su base almeno annuale, da effettuarsi più frequentemente laddove si effettuino trapianti. Viene anche suggerito il numero di prelievi da eseguire in relazione al numero di posti letto per la degenza: in strutture con meno di 500 posti letto devono essere controllati almeno 10 siti distali; diversamente, se la struttura è più grande, almeno 2 siti distali ogni 100 posti letto. Tali prelievi devono essere effettuati in aree a rischio.

Nelle linee-guida CDC si legge invece come in assenza di casi sia proposta essenzialmente una stretta sorveglianza clinica ma non sia indicata una sorveglianza ambientale con controlli microbiologici dell'acqua di routine, se non nei reparti ad alto rischio (trapiantologia) dove *Legionella* spp. deve essere assente. Questo rappresenta una novità per le linee guida della CDC, dove fino al 2002 la prevenzione primaria non era proposta neppure per le aree ad alto rischio. Anche laddove la sorveglianza sia intrapresa, non vengono fornite indicazioni circa le modalità di prelievo, la frequenza dei campionamenti o l'interpretazione dei risultati. Le motivazioni sulla base delle quali non è consigliata la sorveglianza ambientale di routine come

prevenzione primaria specie nelle aree a rischio basso-intermedio sono molteplici: il microrganismo è ubiquitario, dunque i risultati potrebbero essere difficili da interpretare; non è stata identificata una correlazione univoca tra l'entità della carica microbica ed il rischio infettivo, essendo numerosi i fattori che entrano in gioco (fonti di contagio, suscettibilità individuale, etc.) ed essendo il germe sostanzialmente a bassa virulenza; in presenza di risultati positivi possono essere intraprese misure di controllo costose e forse a volte inutili; in presenza di risultati negativi c'è il rischio che si crei una sicurezza che riduca l'indice di sospetto e la sorveglianza clinica, con generale abbassamento dell'attenzione verso questa problematica ed aumento dei casi misconosciuti. In presenza invece di uno o più casi di legionellosi viene indicata l'opportunità di ricorrere a studi di epidemiologia ambientale e metodi di bonifica, seguiti da controlli periodici (ogni 2 settimane per i primi 3 mesi, mensilmente nei 3 mesi successivi).

Per quanto riguarda le proposte di altri Paesi, soprattutto europei, gli approcci formulati sono tra loro analoghi. Nelle linee-guida italiane si legge come la ricerca di *Legionella* spp. vada condotta negli ospedali con monitoraggio periodico dei reparti ad alto rischio. Viene proposto anche un calendario per i controlli ambientali che segua la disinfezione, qualora il livello di contaminazione ne imponga l'effettuazione, nel modo seguente: controllo immediato dopo la bonifica, se il risultato è negativo si ripete dopo 15-30 gg, se negativo dopo 3 mesi, se negativo ogni sei mesi periodicamente. Nelle linee-guida inglesi è proposta la sorveglianza ambientale come prevenzione primaria nei reparti ospedalieri a maggior rischio. Inoltre, essa risulta appropriata anche in quelle strutture per le quali non si abbiano informazioni attendibili circa le caratteristiche dell'impianto e l'efficacia di provvedimenti di controllo. La frequenza dei controlli è anch'essa dipendente dalle strategie attuate nella struttura in questione: controlli mensili per gli impianti trattati con biocidi, settimanali laddove

questo trattamento non sia impostato finché la contaminazione non risulti sotto controllo, monitoraggio periodico nei reparti a rischio. Anche nelle linee-guida francesi la prevenzione primaria è auspicata negli ospedali, con controlli almeno annuali e semestrali nei reparti ad alto rischio.

Da questa breve analisi delle linee-guida e delle raccomandazioni proposte si può comprendere come sia in forte aumento da alcuni anni l'attenzione rivolta al controllo del rischio infettivo da *Legionella* spp. e ciò è legato alla migliore conoscenza di una patologia grave e frequente, prevenibile, tuttora relativamente sottostimata, che spesso stenta ad essere riconosciuta tempestivamente. Una conoscenza più profonda di questa malattia è diventata possibile grazie anche alle tecniche di biologia molecolare, con le quali è divenuto possibile individuare i ceppi batterici responsabili delle infezioni e fare analisi epidemiologiche più precise, potendo risalire alla fonte di contagio ed avendo gli strumenti per una valutazione del rischio idrico più precisa anche all'interno di una struttura complessa come quella ospedaliera.

### **3.2 Metodi di prevenzione e controllo della contaminazione del sistema idrico**

Le strategie di prevenzione della contaminazione microbica si avvalgono di accorgimenti tecnici messi in atto per rendere le condizioni ambientali vigenti nella rete idrica il più dissimile possibile dalle condizioni ideali per la sopravvivenza e la crescita di *Legionella*. Queste procedure vanno attentamente programmate e messe in opera durante la progettazione, l'installazione, il funzionamento e la manutenzione di un sistema. Sebbene sia evidente che esse, pur quando attuate correttamente, non siano in grado di azzerare la presenza dei microrganismi nella rete di distribuzione (obiettivo scarsamente realizzabile), sono però in grado di ridurre

considerevolmente il rischio idrico. Risulta utile in questo senso: effettuare una manutenzione periodica della rete idrica che preveda una accurata pulizia dell'impianto; provvedere all'eliminazione di tratti ciechi "dead legs" senza sbocco terminale, nei quali si verifica ristagno di acqua e dove tende a formarsi il biofilm; utilizzare strategie di disinfezione per ridurre la presenza di alghe verdi, protozoi ed altri batteri che possano costituire nutrimento e protezione per *Legionella* spp.; prediligere per le tubature materiale inidoneo all'adesione da parte di *Legionella* spp.; cercare di limitare la possibilità che si creino nicchie biologiche per i batteri mediante la rimozione dei sedimenti ed eventualmente l'uso di addolcitori. Si può ricorrere anche all'uso di filtri applicati all'acqua potabile in entrata; tenere ben separate le tubature dell'acqua calda da quelle dell'acqua fredda; tenere la temperatura dell'acqua al di fuori dell'intervallo di crescita di *Legionella* spp. Ciò significa che l'acqua fredda non dovrebbe mai superare i 20°C, e quella calda dovrebbe possibilmente superare i 55°C.

La principale difficoltà che si pone nell'ambito della disinfezione della rete idrica consiste nel fatto che si tratta di acqua potabile. Risulta quindi comprensibile come metodiche più aggressive possano essere impiegate nelle acque non destinate al consumo umano in quanto al riparo da rischi in termini di salute, mentre all'interno della rete di distribuzione devono essere adoperati disinfettanti sicuri per il consumo umano, sia in termini di natura chimica che di concentrazione. Sono state descritti numerosi metodi di controllo della colonizzazione della rete idrica. Alcuni di essi sono utili per una rapida decontaminazione dell'impianto, ad esempio laddove si rilevi una carica batterica nell'acqua al punto d'uso estremamente elevata (il valore di riferimento può variare a seconda delle normative vigenti) e si voglia procedere ad una bonifica rapida del sistema, e sono caratterizzati da una breve durata d'azione. Altri metodi sono invece più appropriati per un controllo della legionellosi a lungo termine, applicati in genere nell'ambito

di una globale valutazione e gestione del rischio idrico, anche se di solito necessitano di tempi lunghi per raggiungere la massima efficacia. Globalmente, le misure di controllo si possono suddividere tra misure fisiche e misure chimiche. Tra le prime si annoverano i trattamenti termici, l'uso di radiazioni ultraviolette o la filtrazione al punto d'uso. Tra le seconde invece sono compresi l'uso di metodiche di ionizzazione, l'uso di agenti ossidanti e l'uso di agenti non ossidanti.

Tra i metodi di bonifica, rapidamente efficaci, si annoverano lo shock termico e l'iperclorazione.

**Lo shock termico** consiste nell'elevare la temperatura dell'acqua per 3 giorni fino a temperature superiori a 70°C, facendo scorrere quotidianamente l'acqua al punto d'uso per almeno 30 minuti. E' una metodica che presenta l'intuitivo vantaggio della velocità e relativa semplicità di esecuzione, pur necessitando di una notevole mobilitazione di personale. Risulta efficace immediatamente ma a condizione che il tempo di scorrimento quotidiano dell'acqua sia di almeno 30 minuti (esistono alcune discrepanze in merito tra le linee-guida di diversi Paesi), e che al punto d'uso la temperatura raggiunga almeno i 60°C. Inoltre non determina la formazione di prodotti tossici. Il principale svantaggio, oltre al costo significativo, è la breve durata dell'azione di questo provvedimento: è stata dimostrata una nuova colonizzazione nella rete idrica già dopo alcune settimane.

**L'iperclorazione** viene effettuata con cloro, il quale è il più usato tra gli agenti ossidanti. Esso può essere usato in continuo a bassa dose oppure, a dosaggi più alti, sotto forma di iperclorazione shock. Questa metodica consiste in una singola immissione di una dose elevata di cloro nella rete idrica allo scopo di ottenere in tutto l'impianto così come al punto d'uso

concentrazioni di almeno 20-50 ppm (o mg/l). Dopo un lasso di tempo variabile a seconda della concentrazione ottenuta (1-2 ore) si effettua un drenaggio dell'acqua e si fa scorrere nuova acqua fino ad ottenere concentrazioni di cloro residuo pari a 0,5- 1 ppm. Questa metodica è caratterizzata da una relativa velocità di esecuzione e da una buona efficacia. I principali svantaggi legati alla sua applicazione sono l'azione corrosiva sulle condutture metalliche (azione direttamente proporzionale alle concentrazioni di cloro) e l'elevata formazione di DPB (disinfection-by-products), ovvero sottoprodotti di disinfezione che si formano a causa della reazione del cloro con composti organici presenti nelle reti idriche. Esistono centinaia di DPB, un esempio dei quali è dato dai trialometani (cloroformio  $\text{CHCl}_3$ , diclorometano di bromo  $\text{CHBrCl}_2$ , tribromometano di cloro  $\text{CHBr}_2\text{Cl}$  e tribromometano  $\text{CHBr}_3$ ), sostanze dotate di tossicità epatica e renale e ritenute cancerogene.

**Il mantenimento costante della temperatura dell'acqua calda al di sopra di 55°C** è un provvedimento che sembra essere tra i più significativi; è efficace sia come strategia di prevenzione della colonizzazione da *Legionella* spp, sia come metodo di controllo della sua crescita nelle reti ospedaliere. E' stato dimostrato da studi prospettici come il mantenere la temperatura dell'acqua calda invariabilmente al di sopra di 55°C pur non azzerando la contaminazione sia in grado di ridurre significativamente la carica microbica nell'acqua prelevata al punto d'uso e si sia dimostrato un provvedimento efficace nel diminuire l'incidenza della legionellosi nosocomiale in strutture nelle quali fosse stata impostata una stretta sorveglianza clinica. Esistono tuttavia anche degli svantaggi legati a questa metodica: i consumi di energia necessari per applicarla sono elevati, a volte incompatibili con generali criteri di economia energetica. Inoltre possono presentarsi problemi di sicurezza per gli utenti (ustione).



Per quanto riguarda **la ionizzazione con rame/argento**, questi due elementi interferiscono con i sistemi enzimatici della respirazione cellulare e si legano al DNA con un effetto sinergico. Sono inoltre in grado di agire a livello della parete cellulare del batterio, alterandone la permeabilità e conducendo la cellula alla lisi e dunque alla morte cellulare. Sono aggiunti nell'acqua elettroliticamente o come ioni metallici in quantità pari a 100-400 µg/l per il rame e 10-40 µg/l per l'argento. Come dosi di attacco sono suggerite 200-800 µg/l per il rame e 20-80 µg/l per l'argento. Questo metodo è facilmente applicabile non risentendo nella sua efficacia di variazioni della temperatura dell'acqua; inoltre il rame è in grado di penetrare nel biofilm esplicando anche a questo livello la sua azione battericida. L'utilizzo degli ioni però richiede una attenta valutazione delle dosi secondo le caratteristiche del sistema, il monitoraggio dei livelli raggiunti (tenendo conto dei limiti per le acque potabili) ed una costante manutenzione degli elettrodi. Un ulteriore svantaggio di questa metodica consiste nella diminuzione dell'efficacia con l'aumento del pH.

E' stato inoltre recentemente suggerito che *Legionella* sia in grado, dopo un' esposizione prolungata, di sviluppare resistenza nei confronti di questi ioni (soprattutto verso l'argento) probabilmente grazie all'espressione di un cluster di geni ubicati nella cosiddetta "efflux island", che codificano per proteine di trasporto di metalli pesanti.

Anche **le radiazioni UV a breve lunghezza d'onda** sono note per il loro effetto battericida, che si esplica maggiormente ad una lunghezza d'onda di 254nm. Il meccanismo con il quale agiscono è la formazione di dimeri di timina nel DNA; in tal modo determinano l'arresto della replicazione del DNA stesso. In genere l'irradiazione avviene vicina al punto d'uso affinché l'efficacia sia massima sull'acqua che entra a contatto col consumatore.

Questa tecnica non produce residui chimici e ciò è al contempo un vantaggio, per la sua salubrità, ed uno svantaggio, poiché la sua azione è molto circoscritta nello spazio e nel tempo. Inoltre è spesso inficiata da un'eventuale torbidità dell'acqua e necessita di un modesto spessore di acqua (c.a. 3 cm) per poter agire efficacemente. La sua azione non si esplica sui batteri avvolti nella matrice del biofilm.

**La clorazione in continuo** viene effettuata con disinfettanti ad azione ossidante come il cloro, probabilmente il disinfettante più usato al mondo. Esso è un agente ossidante noto per esplicare la sua azione battericida a vari livelli: forma derivati clorati reagendo con le basi azotate puriniche e pirimidiniche; determina decarbossilazione ossidativa degli aminoacidi; inibisce gli enzimi del metabolismo intermedio; disaccoppia la fosforilazione ossidativa; inibisce la sintesi proteica; induce lesioni nel DNA mono- e bicatenario; blocca trasporti attivi di membrana. L'acqua viene in genere clorata attraverso l'aggiunta di ipoclorito di calcio o di sodio; si forma così acido ipocloroso (HOCl) che ha un  $pK_a$  di 7,6 a 21°C. Dunque a valori di pH inferiori prevale la sua forma indissociata che è dotata di maggior attività battericida; invece a  $pH \geq 7,6$  si ritrova soprattutto lo ione ipoclorito  $OCl^-$  scarsamente efficace contro i batteri. Pertanto si comprende come l'efficacia di questo disinfettante vari a seconda delle condizioni ambientali. Anche la temperatura ne modifica l'attività, essendo l'acido ipocloroso più attivo ad alte temperature anche se in tali condizioni si degrada più rapidamente. I valori di disinfettante residuo devono essere compresi tra 1 e 3 ppm; a questi livelli il suo profilo di azione sul biofilm appare soddisfacente, con riduzione della carica microbica ed assottigliamento del biofilm stesso.

E' emerso da studi sperimentali come *Legionella* spp. sia più resistente di batteri quali *E. coli* nei confronti del cloro (Kutchka ha dimostrato come per

ottenere un riduzione della carica microbica pari al 99% a 21°C, pH 7,6 e 0,1 ppm di cloro libero residuo siano serviti 40 min per ceppi ambientali di *L. pneumophila* e meno di un minuto per *E. coli*). Un altro punto a sfavore di questa metodica consiste nella sua azione corrosiva nei confronti delle condutture metalliche, e nella formazione di DPB.

**Il biossido di cloro** viene usato come disinfettante dell'acqua potabile fin da metà degli anni 50. Si tratta di un gas giallo-verdastro estremamente reattivo, che agisce come ossidante selettivo grazie al trasferimento di un singolo elettrone a seguito del quale si riduce a clorito ( $\text{ClO}_2^-$ ). Ad alte concentrazioni (superiori al 10%/v) reagisce violentemente con agenti riducenti; è stabile invece a basse concentrazioni a riparo dall'esposizione alla luce solare. Proprio per la sua estrema reattività non può essere stoccato e trasportato, ma deve essere prodotto nel sito di utilizzo solitamente a partire da cloro gassoso e colorito di sodio ( $\text{NaClO}_2$ ). Il bersaglio molecolare di questo disinfettante non è stato individuato con certezza: si ritiene che nelle cellule batteriche esso blocchi la sintesi proteica e sia in grado di alterare la permeabilità di membrana alterando la struttura delle proteine di parete e perossidando i lipidi. I valori di disinfettante residuo nell'acqua devono essere comprese tra 0,1 e 1 ppm. E' estremamente solubile in acqua, soprattutto a basse temperature. A differenza del cloro la sua efficacia rimane stabile al variare sia della temperatura che del pH. Questo disinfettante è risultato tra i migliori per quanto riguarda l'efficacia sul biofilm; a livello sperimentale è stato infatti dimostrato come un'esposizione costante per almeno 70 giorni a valori di  $\text{ClO}_2$  di 0,2 ppm elimini la flora residente in un biofilm (creato artificialmente mediante lo scorrimento dell'acqua in un tubo di silicone), e sia in grado di assottigliare fortemente il biofilm stesso. Dalle esperienze descritte da numerosi Autori emerge come questo disinfettante sia sicuro nel suo utilizzo nelle reti di

acqua potabile, non dia luogo a differenza del cloro alla formazione dei DBP, abbia uno scarso impatto sulla corrosione delle condutture metalliche, non alteri in modo significativo le caratteristiche organolettiche dell'acqua e soprattutto sia dotato di ottima efficacia nella sua azione battericida soprattutto nei confronti di *Legionella* spp. Infatti nelle strutture dove è stato applicato in concomitanza delle summenzionate strategie di prevenzione della colonizzazione microbica è in generale risultato in grado di diminuire fortemente il numero di siti risultati positivi ai prelievi effettuati e in questi abbia abbattuto in modo statisticamente significativo la carica microbica. Si è in alcuni casi anche dimostrato in grado di eradicare completamente la legionella dalle reti idriche di presidi ospedalieri. I due principali svantaggi che emergono dell'uso di questo disinfettante sono la scarsa maneggevolezza, con necessità di ricorrere all'installazione di generatori nel sito di utilizzo (con aumento dei costi di gestione) (Figura 2) e la formazione di prodotti terminali di reazione costituiti per il 70% da clorito ( $\text{ClO}_2^-$ ) e per il 30% da clorato ( $\text{ClO}_3^-$ ) i quali devono rientrare all'interno di parametri stabiliti dalla legge.



**Figura 2** - Generatore di Biossido di cloro

**Il trattamento con le clorammine** viene impiegato da più di 20 anni negli USA per la disinfezione delle acque potabili. In Italia è stato recentemente sperimentato nel trattamento disinfezione dell'acqua calda sanitaria.

Le clorammine sono dei composti chimici che si ottengono per reazione fra cloro e ammoniaca, quindi sono delle ammine aventi almeno un atomo di cloro direttamente legato all'azoto. Le clorammine sono frequentemente prodotte tramite l'aggiunta di ammoniaca ad acqua contenente cloro libero ( $\text{HOCl}$  o  $\text{OCl}$ , a seconda del pH ) e la seguente reazione assume il valore di pH pari a 8,4. Quando avviene la seguente reazione:  $\text{NH}_3(\text{aq}) + \text{HOCl} \rightarrow \text{NH}_2\text{Cl} + \text{H}_2\text{O}$

si possono formare tre tipi di clorammine inorganiche, le quali vengono distinte in base a 3 diversi valori di pH: le triclorammine ( $\text{NCl}_3$ ) hanno un peso molecolare di 199 g/moli e si formano quando il valore del pH è inferiore a 3; le diclorammine ( $\text{NHCl}_2$ ) hanno un peso molecolare di 85 g/moli e si formano quando il pH va da 4 a 7; le monoclorammine ( $\text{NH}_2\text{Cl}$ ) hanno un peso molecolare di 52 g/moli e si formano quando il pH è superiore a 7. Anche la quantità di cloro ed ammoniaca nell'acqua influenza la generazione delle clorammine. Il rapporto di cloro/ammoniaca è idealmente 6:1. Durante la produzione della clorammina il rapporto è solitamente 3-5:1. Quando le concentrazioni di ammoniaca sono più alte, si formano più di- e tri-clorammine. Durante queste reazioni si possono formare anche clorammine organiche ( $\text{RNHCl}$ ), le quali costituiscono una categoria vasta e pertanto non si formano ad un preferenziale valore del pH e non possono essere distinte da altre clorammine usando i metodi di analisi standard. Le clorammine inorganiche, il cloro libero e le clorammine organiche sono chimicamente correlate e possono trasformarsi facilmente una nell'altra, ma questi composti non possono essere trovati in forma isolata. Le clorammine inorganiche formano residui che sono più persistenti dei composti di cloro comunemente disponibili. La ricerca ha indicato che

metà della vita delle delle clorammine inorganiche può variare da 1 minuto a 23 giorni, a seconda delle circostanze.

Le clorammine possono essere usate come candeggianti, disinfettanti ed ossidanti. I disinfettanti organici liberano lentamente il cloro, causando una disinfezione più lenta e meno aggressiva rispetto alla disinfezione effettuata con ipoclorito. Esse possono essere usate per migliorare le proprietà organolettiche dell'acqua quando il cloro viene usato come disinfettante. Esse sono inoltre usate per la disinfezione dell'acqua potabile e dell'acqua di scarico e per resistere al biofouling nelle torri di raffreddamento.

Quando le clorammine sono usate come disinfettante viene aggiunta ammoniaca all'acqua precedentemente trattata con cloro; infatti l'ammoniaca si aggiunge dopo il cloro in modo che questo ultimo possa portare i valori di CT (prodotto tra la concentrazione di disinfettante in mg/l ed il tempo del contatto in minuti, necessario per disattivare un microorganismo) più bassi rispetto a quelli ottenuti aggiungendo prima ammoniaca. Per l'uccisione dei batteri e di altri microrganismi le clorammine sono efficaci quanto l'ipoclorito, anche se il meccanismo di reazione è più lento. Entrambi i composti sono ossidanti ed uccidono i batteri penetrando nella parete cellulare e bloccando il metabolismo cellulare. Le clorammine agiscono sulla parete batterica formando composti tossici (N-cloro derivati) che uccidono il microorganismo (Block, 2001), ma rispetto al cloro libero sono più stabili, quindi l'azione disinfettante risulta essere più duratura e meno aggressiva sull'impianto di distribuzione; tuttavia, l'efficacia risulta inferiore di circa 2000 e 100000 volte su *E.Coli* e rotavirus, rispettivamente, rispetto all'utilizzo del cloro libero. Per questo motivo la clorammina non può essere utilizzata come disinfettante primario, ma solo come disinfettante residuo, nella rete di distribuzione dell'acqua. La persistenza della monoclorammina in rete è 20 volte più alta del cloro libero. Quindi, al contrario del cloro, le clorammine

non scompaiono quando l'acqua rimane ferma per alcuni giorni e di conseguenza esse devono essere eliminate dall'acqua, ad esempio, usando carbonio attivo granulare o acido acetico.

L'effetto battericida delle clorammine è influenzato anche dalla temperatura dell'acqua, infatti occorrono concentrazioni di disinfettante 2,5 volte più alte e tempi di esposizione 9 volte più lunghi per ottenere la stessa azione battericida a 3°C rispetto a 20°C (Weidenkopf, 1953).

L'efficacia delle clorammine come disinfettanti dipende strettamente dal tipo di clorammina, quindi dal pH; infatti, le clorammine organiche da questo punto di vista sono inefficaci; le tricolorammine, invece, avendo un pH inferiore a 3 hanno una media efficacia di disinfezione. Le diclorammine e le monoclorammine, avendo valori di pH più elevati assumono un effetto biocida buono. In particolare, le diclorammine (pH 4-7) rispetto alle monoclorammine (pH maggiore di 7) sono più battericide perchè sono meno stabili e si idrolizzano più facilmente. Inoltre, le diclorammine penetrano benissimo contro le cisti di *E. histolytica* (Fair, 1947).

Le monoclorammine sono maggiormente impiegate per la prevenzione della legionellosi, quindi vengono utilizzate come sistema di disinfezione in continuo nella rete di distribuzione dell'acqua nelle strutture complesse, come gli ospedali. Alcuni studi hanno documentato questa efficacia osservando una diminuzione dal 60 al 4% dei siti positivi per *Legionella* spp. quando è avvenuto il passaggio dalla disinfezione a base di cloro a quella con monoclorammina (Flannery, 2006). La scelta della monoclorammina dipende dal fatto che il continuo utilizzo del biossido di cloro e dell'ipoclorito a lungo andare potrebbe danneggiare o invecchiare precocemente le tubazioni in materiale plastico a causa del forte potere ossidante. La monoclorammina, essendo un ossidante blando, è compatibile con tutti i tipi di materiali plastici, come polietilene (PE), polipropilene

(PP), polivinilcloruro (PVC), ecc; ha un'azione meno aggressiva di quella dell'ipoclorito e del biossido di cloro; ed inoltre, proprio grazie alla sua più lenta azione, è in grado di penetrare maggiormente il biofilm batterico, mantenendo quindi l'efficacia sia del biossido di cloro che dell'ipoclorito. La monoclorammina, inoltre, forma pochi sottoprodotti della disinfezione, quindi scarsi trialometani (THM), infatti dopo l'introduzione delle monoclorammine c'è stata una riduzione dei THM dal 40 all'80% (Kirmeyes, 1993). Nonostante questo vantaggio i precursori delle clorammine devono essere correttamente dosati perchè se presenti in eccesso possono provocare la produzione di idrazina, composto tossico e cancerogeno che agisce al livello respiratorio, epatico e renale (Chouldhary, 1998); e la nitrificazione dell'acqua, fenomeno dannoso per i soggetti più deboli e per i neonati. Quando nell'acqua sono presenti elevate quantità di composti organici (superiori a 3 ppm), l'azoto organico causa la formazione di ammine organiche, le quali non possiedono le stesse proprietà di disinfezione delle monocloroammine inorganiche.

Nonostante ciò, la scarsa produzione di THM nell'acqua da parte delle monoclorammine fa sì che possano essere molto adatte alla potabilizzazione delle acque con un valore guida di 3 ppm, consigliato da WHO (WHO 2004 - *Guidelines for drinking-water quality - 3rd edition*), e di 4 ppm, secondo l'*Environmental Protection Agency* (EPA).

**La filtrazione ai punti d'uso** viene effettuata mediante filtri, in quali rientrano tra i mezzi fisici di controllo della concentrazione di *Legionella* spp. nelle acque al punto d'uso. Si tratta di dispositivi monouso che contengono una membrana filtrante con porosità di 0,2 µm di diametro e che si applicano direttamente al punto d'uso (doccia, rubinetto) (Figura 3). Il ridotto calibro dei pori del filtro permette che siano trattenuti nelle maglie della membrana anche batteri piccoli come *Legionella* spp. Numerose sono



le evidenze sull'efficacia dei filtri: studi condotti a tal proposito hanno mostrato un sostanziale azzeramento della conta microbica di batteri quali *L. pneumophila* e *Mycobacterium* spp. e le rare positività sono emerse solo con la senescenza del filtro stesso. Qui risiede il principale svantaggio di questa metodica; i filtri infatti, pur garantendo un'acqua di qualità elevatissima, sono dotati di vita breve. Col passare del tempo i pori si otturano, e inoltre non sussiste più la garanzia della loro efficacia nel trattenere i patogeni idrodiffusi. Esistono filtri validati per una durata di 7 giorni ed altri che devono essere sostituiti ogni 15. Si comprende come la loro manutenzione sia quindi impegnativa e dispendiosa, e come pertanto essi non possano essere usati ubiquitariamente nei presidi ospedalieri ma debbano essere fatte valutazioni di opportunità e costo/beneficio per quanto riguarda la loro installazione. Recentemente sono stati messi in commercio filtri validati per una durata di 30 giorni, e sono usciti studi che ne confermano l'efficacia anche al termine del loro periodo di validità. Essi potrebbero consentire nei reparti più critici una gestione del rischio più sicura e meno dispendiosa rispetto agli altri modelli.

Anaissie *et al.* hanno proposto la strategia di uso di acqua sterile al punto d'uso per quanto riguarda l'approvvigionamento idrico dei reparti ad alto rischio. E' stato suggerito come l'acqua sterile debba essere usata per tutte le applicazioni, dalla preparazione del cibo all'igiene personale, al lavaggio delle strumentazioni sanitarie. Esistono evidenze in letteratura che indicano questa strategia come una tra le più auspicabili per la gestione dei pazienti a rischio. Questa metodica però presenta delle limitazioni, sia a carattere pratico (soprattutto inerenti l'igiene personale, ad es. fare la doccia) sia di tipo economico, essendo molto elevato il costo di un simile approvvigionamento.



**Fig. 3** - Filtri integrati monouso per la prevenzione da legionella

Come si può osservare non esiste un metodo che sia al contempo efficace e scevro da complicazioni. Ogni metodica presenta vantaggi e svantaggi, ed è opinione che la scelta della misura di controllo da applicare vada ponderata caso per caso, dopo attenta valutazione del singolo presidio anche da un punto di vista strutturale, non prescindendo della tipologia di paziente ospitato. A seconda infatti del reparto considerato è opinione condivisa che diversi debbano essere gli obiettivi, le soglie di intervento e gli interventi correttivi. Esistono discrepanze a questo proposito nelle linee-guida e nelle raccomandazioni emanate nei vari Paesi. Infatti si può affermare che esista un consenso unanime sulla necessità di fornire un approvvigionamento idrico che abbia una qualità molto elevata nei reparti “a rischio” e che comunque sia adeguato all’utenza anche negli altri reparti. Tuttavia sussistono alcune differenze. In primo luogo non c’è omogeneità circa la valutazione dell’entità del rischio in rapporto al numero di siti positivi o alla carica microbica al punto d’uso. Non sempre viene attribuito inoltre un ruolo preciso ad una tappa fondamentale nel piano di sicurezza idrica qual è quella della sorveglianza ambientale, specialmente in quelle strutture dove non si siano mai verificati casi di legionellosi nosocomiale (prevenzione primaria). Sussistono anche differenze nella descrizione delle modalità di prelievo dell’acqua per l’analisi microbiologica e nelle soglie di intervento per quanto riguarda la contaminazione microbiologica (valutate in UFC/L), che variano da Stato a Stato.

## **Cap.4 - SOTTOPRODOTTI DELLA DISINFEZIONE ED EFFETTI SULLA SALUTE**

I sottoprodotti della disinfezione (DBP) ( disinfection-by-products ) sono sostanze chimiche, organiche e inorganiche che si possono formare durante reazione di un disinfettante con materiale organico naturalmente presente nell'acqua.

Durante i primi anni 70 fu dimostrata la possibilità della formazione di DBP, nel 1974 venne promulgata una lista di 187 sostanze organiche presenti in acqua potabile ed alcune di queste sostanze sono cancerogene o mutagene.

Dopo tale scoperta fu realizzata un'ampia ricerca sull'origine di tali sostanze, sui loro effetti sulla salute e sulle procedure per impedire la formazione di questi prodotti durante il processo di disinfezione.

Ad esempio la scoperta del cloroformio in acqua potabile clorurata ha portato all'effettuazione di ricerche sugli effetti di questo sulla salute e trovarono che il cloroformio è cancerogeno per gli animali da laboratorio in caso di esposizione ad elevate concentrazioni.

I sottoprodotti della disinfezione si possono formare quando i disinfettanti, come il cloro, reagiscono con composti naturalmente presenti nell'acqua. La formazione di tali prodotti avviene soprattutto tramite reazioni in cui prendono parte sostanze organiche come, acido umico e acido fulvico. Questi materiali finiscono nell'acqua durante la decomposizione della materia delle piante.

I tipi di sottoprodotti di disinfezione che si formano dipendono da diversi fattori come:

- tipo di disinfettante
- dose di disinfettante
- residuo di disinfezione

Quando la dose ed il residuo di disinfettante sono più alti si formano maggiori DBP

-condizioni di disinfezione: tempo di reazione, temperatura e pH

Quando il tempo di reazione è più breve, si possono formare maggiori concentrazioni di trialometani (THM) ed acidi acetici alogenici (HAA).

Quando il tempo di reazione è più lungo, certe forme temporanee di sottoprodotti di disinfezione possono trasformarsi in prodotti finali di disinfezione, come l'acido acetico di tribromina o bromoformio. Aloacetoni (HAN) e alochetoni (HK) vengono decomposti.

Quando la temperatura aumenta, le reazioni avvengono più velocemente, richiedendo una maggiore concentrazione di cloro per una disinfezione adeguata. Ciò causa la formazione di sottoprodotti di disinfezione più alogenici. Un aumento della temperatura aumenta inoltre la decomposizione degli acidi acetici di tribromina, HAN e HK.

Quando il livello di pH è elevato, si formano più ioni ipoclorito, provocando una diminuzione nell'efficacia della disinfezione con cloro. A valori più elevati di pH, si forma più THM, mentre più HAA si forma quando il valore di pH è più basso. A pH elevato HAN e HK sono decomposti tramite idrolisi, a causa di un aumento nelle reazioni di idrolisi a più alti valori di pH.

I livelli di trialometani in acqua potabile sono spesso più alti nella rete di distribuzione che presso le aziende di produzione dell'acqua potabile. Quando avviene l'idrolisi molti sottoprodotti di disinfezione si trasformano in trialometani

Anche la concentrazione e le proprietà della materia organica naturalmente presente nell'acqua (NOM) condiziona il tipo di sottoprodotto di disinfezione.

NOM è il predecessore di un sottoprodotto di disinfezione. Il livello di materia organica è registrato solitamente come "concentrazione di carbonio

organico totale" o "concentrazione di carbonio organico disciolto". La composizione e la concentrazione della materia organica naturalmente presente determina il tipo e la concentrazione di sottoprodotti di disinfezione che verranno infine formati. La materia organica naturalmente presente contiene composti, come gli acidi umici, gli acidi fulvici, gli acidi idrofobi, le sostanze neutre idrofobiche, acidi transfilici, le sostanze neutre transfiliche, gli acidi idrofili e le sostanze neutre idrofile.

Tutti i disinfettanti chimici causano la formazione di sottoprodotti di disinfezione (Tabella 4).

Tuttavia, non tutti i sottoprodotti di disinfezione sono stati ricercati.

Maggiore ricerca è stata effettuata sui sottoprodotti clorurati di disinfezione, a causa del vasto uso di cloro come disinfettante dell'acqua potabile.

**Tab. 4** - Sottoprodotti della disinfezione da vari disinfettanti

<b>Disinfettante</b>	<b>Sottoprodotti di disinfezione Organoalogenici</b>	<b>Sottoprodotti di disinfezione inorganici</b>	<b>Sottoprodotti di disinfezione non-alogenici</b>
<i>Cloro</i> (Cl <sub>2</sub> )/ <i>acido ipocloroso</i> (HOCl)	trialometani, acidi acetici alogenici, aloacetoni-trili, cloridrato, cloropicrina, clorofenoli, N-clorammine, alofuranoni, bromoidrine	clorati (soprattutto per applicazione di ipoclorito)	aldeidi, acidi alcanici, benzene, acidi carbossilici
<i>Biossido di cloro</i> (ClO <sub>2</sub> )		clorito, clorato	non noto
<i>Clorammine</i> (NH <sub>3</sub> Cl etc.)	aloacetoni-trili, cianoclorina, cloroammine organiche, cloramminoacidi, cloridrati, alochetoni,	nitrito, nitrato, clorato, idrazina	aldeidi, chetoni

## **EFFETTI SULLA SALUTE**

### **TRIALOMETANI**

*Cloroformio*

Cancerogeno, epatotossico, tossico renale

*Diclorobromometano*

Epatotossico, tossico renale

*Dibromoclorometano*

Epatotossico, tossico renale

*Bromoformio*

Epatotossico, tossico renale

### **ACETONITRILI**

*Cloroacetoneitrile*

Genotossico

*Dicloroacetoneitrile*

Mutageno, genotossico

*Tricloroacetoneitrile*

Genotossico

*Bromocloroacetoneitrile*

Mutageno, genotossico

### **ALOACIDIDERIVATI**

*Acidodicloroacetico*

Dismetabolizzante

## CLOROFENOLI

*2-clorofenolo*

Fetotossico, cancerogeno

*2,4-diclorofenolo*

Fetotossico, cancerogeno

*2,4,6-triclorofenolo*

Cancerogeno

## CHETONICLORURATI

*1,1-dicloropropanone*

Mutageno

*1,1,1-tricloropropanone*

Mutageno

*1,1,3,3-tetracloropropanone*

Mutageno

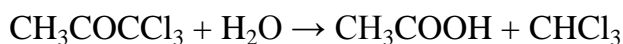
### ➤ TRIALOMETANI

I trialometani ( $\text{CHX}_3$ ) furono tra i primi sottoprodotti di disinfezione ad essere stati scoperti in acqua clorinata. Queste sostanze si formano durante la disinfezione del cloro e la disinfezione con disinfettanti clorurati. I trialometani possono essere divisi in triclorometano (cloroformio,  $\text{CHCl}_3$ ), diclorometano di bromo (BDCM,  $\text{CHBrCl}_2$ ), dibromometano di cloro ( $\text{CHBr}_2\text{Cl}$ ) e tribromometano ( $\text{CHBr}_3$ ). Sebbene tali sostanze consistono sia in metani clorurati che bromurati, non si formano per reazione fra cloro e metano. Le sostanze si formano durante la reazione fra cloro e la materia organica contenuta nell'acqua.

La concentrazione di trialometano in acqua superficiale d'estate supera la concentrazione presente d'inverno. Quando il bromo è presente, è più probabile che si formino tribromometani. Prove di laboratorio indicano che

i trialometani si formano durante la reazione fra propanone (sottoprodotto di ozono) e cloro. Il Propanone è immediatamente ossidato a tricloropropanone. Quando il pH è elevato, l'idrolisi può causare la formazione di cloroformio (CHCl<sub>3</sub>) da propanone.

Meccanismo di reazione:



Quando è presente bromo, si forma propanone bromurato, causando la formazione di trialometani bromurati. I trialometani sono formati durante le reazioni di idrolisi di vari sottoprodotti di disinfezione e prodotti trialoalogenici di transizione, come i trialoacetonnitrili, di-trialoacetilideidi e degli acidi trialo acetici bromurati.

I trialometani sono sospettati di creare danni al fegato, reni e al sistema nervoso centrale. Sono inoltre considerati cancerogeni.

#### ➤ ACIDI ACETICI ALOGENICI

Gli acidi acetici alogenici (HAA) sono un tipo importante di sottoprodotti clorurati di disinfezione. Essi consistono in tre atomi di idrogeno che sono fissati ad un COOH. Gli H-atomi degli acidi acetici alogenici sono parzialmente sostituiti dagli atomi dell'alogeno. HAA sono composti non volatili. HAA possono occasionalmente essere trovati nell'acqua in più alte concentrazioni rispetto ai trialometani (THM). Ciò è determinato dal livello di pH dell'acqua. Quando il pH è più basso, si formano più HAA mentre quando il pH è più alto, si formano più THM.

La composizione della materia organica naturalmente presente (NOM) inoltre determina la quantità di THM o di HAA che si formano. Come THM, le concentrazioni di HAA nell'acqua superficiale d'estate superano le concentrazioni d'inverno e l'acqua superficiale contiene più HAA rispetto all'acqua freatica. HAA contribuiscono alla formazione di



THM; durante la decomposizione biologica di HAA, si forma THM. HAA si può anche formare durante la reazione fra propanone e cloro. Quando i valori di pH sono bassi, il tricloropropanone è ulteriormente ossidato per formare tetra-, penta- ed esacloropropanone. Quando questi residui sono idrolizzati, si formano i mono-, di- e tricloro acidi acetici. Gli acidi alogenici sono sospettati di essere cancerogeni.

Negli Stati Uniti l'EPA ha stabilito uno standard di 80 µg/l per acidi acetici alogenici.

L'Organizzazione Mondiale per la Sanità (WHO) non stabilisce nessuno standard per la concentrazione di acidi acetici alogenici (WHO, 2004).

#### ➤ ACETONITRILI (HAN), ALO-ALDEIDI E ALOCHETONI

Questi sottoprodotti di disinfezione sono solitamente presenti in quantità più basse rispetto ai trialometani (THM) ed agli acidi acetici alogenici (HAA). Questi composti si formano solitamente subito durante la disinfezione dell'acqua, ma sono decomposti rapidamente durante le reazioni di idrolisi o le reazioni con i disinfettanti residui. I composti possono anche essere prodotti di reazioni di altri sottoprodotti di disinfezione, come THM e HAA. Quando il pH è elevato, questi composti non si possono formare.

Aloacetoni ntrili si formano durante la reazione tra cloro e acetoni ntrile. Quando il tempo di reazione del disinfettante nell'acqua è basso, questi sottoprodotti di disinfezione si decompongono.

L'acetaldeide di tricloro ed i composti bromurati dell'aldeide sono il secondo più grande gruppo di sottoprodotti di disinfezione immaginabile. Mono e di-cloro acetaldeide si possono formare durante la disinfezione, ma verranno immediatamente ossidati per formare le acetaldeidi di tricloro. L'acetaldeide è un sottoprodotto di disinfezione della disinfezione

dell'ozono. Quando l'ozono è combinato con cloro, si formano trialoacetaldeidi.

Meccanismo di reazione di acetaldeide e cloro:



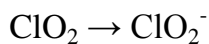
Gli acidi alogeni sono sospettati di essere cancerogeni

➤ MX

Nel 1986 fu scoperto un nuovo sottoprodotto di disinfezione: il furanone 3-cloro-4(diclorometil)-5-idrossilato-2(5H), altrimenti noto come MX circa 30% dell'attività mutagena totale nell'acqua può essere imputata a questo sottoprodotto di disinfezione. L'MX è spesso presente nell'acqua ed è rischioso per la salute, tanto che l'WHO lo ha inserito nella lista delle sostanze potenzialmente pericolose per la salute umana. Non c'è una guida di riferimento per il MX dissolto, a causa di una mancanza di dati tossicologici su tale sostanza. Nella terza edizione delle linee guida sull'acqua potabile del WHO (1997) si raccomanda una concentrazione massima di MX di 1.8 µg/l. Altri sottoprodotti di disinfezione che sono spesso formati durante la clorazione dell'acqua sono alonitrometani, alofenoli e alofurani.

➤ CLORITE

Clorite ( $\text{ClO}_2^-$ ) è un sottoprodotto della disinfezione tramite biossido di cloro. Quando il biossido di cloro è decomposto si forma clorite:



Varie e complesse reazioni realizzano la formazione della clorite da biossido di cloro dissolto. La clorite è sospettata di causare anemia nei bambini piccoli e disordini al sistema nervoso.

Molti DPB sono bio-accumulativi e non sono distrutti dal corpo e possono accumularsi nei tessuti.

La ricerca sugli effetti sulla salute dei sottoprodotti di disinfezione punta sui seguenti temi:

- Gli esseri umani sono esposti a piccole concentrazioni dei DPB per molti anni e gli effetti potranno manifestarsi dopo lunghi periodi di somministrazione
- Tossicità a singoli DPB e a miscele di DPB, questa ricerca viene realizzata su animali da laboratorio.

Una ricerca americana mostra che il bromodichlorometano (BDCM) e l'idrato clorale (CH) riducono la velocità e la mobilità dello sperma nei ratti da laboratorio. L'effetto di BDCM in concentrazioni basse è più forte dell'effetto del CH o di altri sottoprodotti di disinfezione che riducono la velocità dello sperma. (Klinefelter, 1996)

- Nel 2002 ricercatori americani hanno effettuato una ricerca per valutare la cancerogenità mettendo a confronto una somministrazione di singoli DPB o una miscela di DPB. Vennero utilizzati diclorometilidrossifuranone, bromato del potassio ( $KBrO_3$ ), cloroformio ( $CHCl_3$ ) e BDCM in quanto si conosce la loro cancerogenità o tossicità per i reni. I risultati evidenziarono un relazione fra dosaggio e cancro renale, uterino o alla milza mentre non sembrò esserci differenza fra la somministrazione del singolo DPB o di una miscela di DPB (Hooth, 2002).

- La somministrazione ad animali da laboratorio di alte concentrazioni (da 100 mg/l fino 1g/l) di biossido di cloro, cloriti e clorati determinano alterazioni delle loro cellule sanguigne.

Inoltre il biossido di cloro, la clorite ed il clorato alterano il DNA di testicoli e reni. Ciò può implicare che queste sostanze abbiano effetti sulla

riproduzione. Il risultato di queste ricerche non può essere direttamente trasferito all'uomo, ulteriori ricerche devono essere effettuate (Couri, 1982).

Oltre ad esperimenti con animali da laboratorio (ratti e topi) esistono anche studi epidemici sugli effetti di esposizione degli esseri umani ai sottoprodotti di disinfezione in acqua potabile.

-Vari studi hanno evidenziato che l'aumento di clorurati dell'acqua potabile aumenta il rischio di cancro alla prostata e cancro anale. (Morris, 1992).

- Un confronto tra i diversi studi sul consumo specifico di acqua potabile clorurata e l'esposizione a cancro della prostata fornisce un collegamento fra lunga esposizione all'acqua potabile clorurata ed il cancro alla prostata. Anche se il rischio non è molto grande, ma dal momento che molta gente è esposta all'acqua potabile clorurata per molti anni, esso diventa significativo e molti casi di cancro alla prostata possono essere attribuiti ai sottoprodotti di disinfezione (Kogevinas, 2003).

- Una ricerca effettuata in Finlandia sulla relazione tra la lunghezza di esposizione a sostanze mutagene e cancerogene contenute nell'acqua potabile ed il cancro evidenziò l'esistenza di un rapporto fra esposizione ed il rischio di cancro renale e alla vescica (Koivusalo, 1998).

- Una ricerca effettuata in Ontario (Canada), prese in esame anche la concentrazione di trialometani evidenziando come le persone esposte a concentrazioni di 50 µg/l hanno un rischio 1,5 volte più grande di sviluppo di cancro intestinale (Marret and King, 1995). Un' analoga ricerca è stata effettuata nello Iowa (Canada) senza però trovare una relazione fra esposizione a sottoprodotti di disinfezione e cancro intestinale (Mills, 1998).

- Uno studio effettuato nello Iowa (Stati Uniti) nel 1986 e nel 1989 evidenzia uno scarso rapporto fra cancro intestinale e una lunga esposizione all'acqua potabile o ai trialometani mentre è ritenuto molto alto per il cancro

anale. Questo rischio è ancora più grande per la gente che mangia poco alimento fibroso e ha scarsa attività fisica (Hildesheim, 1998).

- L'utilizzo di acque con concentrazioni elevate di trihalometani mostra un collegamento con casi di aborto spontaneo e difetti alla nascita e ritardo nello sviluppo (Wigle, 1998).

- Alcuni casi di nascita prematura e un basso peso alla nascita sono stati correlati all'utilizzo durante la gravidanza di acqua trattata con diossido di cloro (Tuthill, 1982).

- Una ricerca norvegese che utilizzò i dati di 137.000 bambini, mettendo a confronto l'esposizione in gravidanza ad acqua potabile clorurata con una quantità elevata di materia organica naturale ed acqua potabile non-clorurata con una piccola quantità di materia organica naturale. Lo studio non mostrò alcun collegamento fra esposizione all'acqua potabile clorurata e un rischio di sottopeso alla nascita ed una ridotta lunghezza del corpo (Jaakkola, 2001).

- Sempre in Norvegia venne effettuata una ricerca sul rapporto fra i difetti specifici di nascita ed la presenza di DPB e materia organica naturale in acqua potabile. Il rischio di disturbi alla nascita in particolare a cuore, sistema respiratorio e tratto urinario furono associati ad esposizione ai DPB durante la gravidanza (Bing-Fang, 2002).

- Altre ricerche hanno evidenziato una sufficiente relazione fra ritardo nello sviluppo ed esposizione a DPB al tempo stesso non hanno trovato evidenze che si possano collegare a difetti sul sistema nervoso centrale, sul midollo spinale, sull'aborto spontaneo e sulla mortalità (Graves, 2001) (Nieuwenhuijsen, 2000).

- Risultato ben diverso è stato ottenuto in Nuova Scozia (Canada), dallo studio dei dati sulle nascite 1988-1995 confrontati con i dati sulle acque relativi alle concentrazioni bromodichlorometano e cloroformio. L'esposizione durante la gravidanza a concentrazioni di

bromodichlorometano di 20 µg/l o più venne associata ad un rischio elevato di difetti sul tubo neurale. L'esposizione a cloroformio evidenzia un rischio elevato di difetti cromosomici (Dodds, 2001).

- Su 59.000 bambini, nel 2001 in Svezia, venne realizzata una ricerca sul rapporto fra i problemi ad arterie ed al cuore in relazione alle concentrazioni di trihalometani in acqua potabile prima e durante la gravidanza. La ricerca evidenziò che l'utilizzo concomitante di biossido di cloro e di ipoclorito di cloro aumentava il rischio di danni alle arterie ed al cuore rispetto a quando veniva utilizzato il solo ipoclorito di cloro. In tutti i casi i trihalometani risultavano inferiori ai valori standard ciò indica che anche sotto queste concentrazioni si verificano effetti sulla riproduzione. (Cedergren, 2001)

- Nel 1991 l'agenzia internazionale per ricerca sul cancro (IARC) valutò il rischio cancerogeno per la salute dell'acqua potabile clorurata, basandosi su ricerche tossicologiche di laboratorio e su ricerche epidemica sugli esseri umani. Tale studio indicò che è difficile trovare un rapporto fra lo sviluppo del cancro ed il consumo di acqua clorurata. Il rischio è piccolo e non può essere dimostrato con prove epidemiche. Inoltre, tutti i fattori sono importanti per lo sviluppo del cancro, per esempio il fumo, il cibo, l'alcool, la condizione socio-economica e la predisposizione ereditaria. (Disinfectants and Disinfection Byproducts, WHO, 2001).

Non è ancora chiaro se tutti i DPB abbiano effetto sulla salute e se i loro effetti differiscono nel tempo oltre al fatto che nella vita di una persona altri fattori, come fumo ed esposizione ad inquinanti ambientali possono avere un effetto di amplificazione.

Allo stato attuale nessuna ricerca è stata in grado di poter affermare con certezza una correlazione diretta fra DPB e vari problemi alla salute umana, ma analizzando i vari risultati si ha la netta sensazione che i DPB possano aumentare il rischio di certe patologie. Le principali critiche sono legate

all'oggettiva difficoltà di misurare al rubinetto la composizione e la concentrazione di DPB, in quanto possono variare sotto l'influenza del PH, della temperatura e del tempo di contatto nella rete di distribuzione. Tutto ciò rende molto difficile valutare l'effettiva quantità e composizione di DPB assunti dalle varie persone. I risultati di laboratorio evidenziano la tossicità dei DPB, anche se questi risultati non sono trasferibili direttamente alla popolazione è auspicabile che la loro concentrazione e composizione sia quanto più bassa possibile limitando l'utilizzo di disinfettanti solo nei casi di effettiva necessità.

Le aziende di distribuzione dovrebbero potenziare le metodiche per ridurre l'inquinamento microbiologico delle acque così da ridurre al minimo l'utilizzo dei disinfettanti.

I rischi per la salute dei DPB sono minimi se confrontati ai rischi per la salute delle malattie portate dall'acqua. Vediamo il caso del Sud-America, dove l'attenzione in tutto il mondo per i DPB e un gran numero di articoli scientifici sui DPB, fece cessare molti fornitori di acqua potabile di disinfettare la propria acqua con il cloro. Il rischio per la salute dovuto ai microorganismi patogeni in acqua potabile è molto più alto, circa 100.000 – 1.000.000 di volte superiore al rischio di esposizione a lungo termine ai DPB. La diffusione dell'epidemia di colera a tutti e 19 i paesi sudamericani causò 1.200.000 pazienti e 40.000 morti. (WHO, 1994). I rischi per la salute dei DPB sono molto bassi nelle concentrazioni rilevate in acqua potabile. Tuttavia questi rischi non possono essere ignorati, a causa del vasto numero di persone esposte ai DPB. Esiste ancora un vasto numero di DPB che devono essere identificati. Anche i rischi per la salute devono essere ricercati, come pure gli effetti delle miscele dei sottoprodotti di disinfezione. Alcuni DPB possono essere mutageni e devono essere studiati. In generale è meglio rimuovere più materia possibile dall'acqua, prima di applicare la disinfezione, ciò può essere ottenuto con le attuali tecniche di

trattamento delle acque. La coagulazione è usata per rimuovere le particelle e la torbidezza. Il carbone attivo può essere usato per assorbire le sostanze organiche. Le membrane possono essere applicate per rimuovere il materiale organico dall'acqua. Ogni fornitore dovrebbe valutare il punto ottimale per l'applicazione del disinfettante, usare eventualmente un disinfettante alternativo, rimuovendo la materia organica naturale che produce i DPB insieme ai disinfettanti e rimuovendo i DPB in seguito alla disinfezione può consentire il controllo dei DPB.

Quali sono gli standard per i sottoprodotti di disinfezione?

Alcuni BDP sono considerati nocivi per la salute (cloroformio, dibromoclorometano ed il bromoformio sono probabilmente cancerogeni ed il diclorobromometano, il dicloroacetone nitrile e gli idrati clorali, sono possibilmente cancerogeni). Le istituzioni sulla salute di tutto il mondo hanno stabilito gli standard per la massima concentrazione dei DPB in acqua potabile.

#### EU

Nella direttiva europea sull'acqua potabile 98/83/EC (1998) lo standard massimo per trialometani è stabilito a 100 µg/l. Se è possibile i paesi dovrebbero mirare a concentrazioni inferiori.

#### WHO

L'Organizzazione Mondiale per la Sanità WHO descrive standard separati per i trialometani:

- bromodichlorometano (BDCM) 60 µg/l
- bromoformio 100 µg/l
- cloroformio 200 µg/l

#### USA

L'EPA si è occupata della regolamentazione dei DPB negli Stati Uniti dal 1979. Nel 1996 l'Atto sull'acqua potabile sicura fu modificato ed il congresso chiese alla EPA di regolamentare i nuovi standard per i



disinfettanti ed i DPB. Tale revisione punta sulla riduzione del rischio per la salute dei DPB, e protegge la qualità microbiologica dell'acqua. Nel 1998, l'EPA promulgò le *Regole sui sottoprodotti della fase 1 della disinfezione*. Lo standard relativo alla concentrazione totale di trialometani è 80 µg/l e per acido acidico alogenato 60 µg/l. La guida di riferimento inoltre stabilisce che deve essere usata la coagulazione avanzata per rimuovere la materia organica. (EPA, 2001).

## **Cap.5 – RISCHIO LEGIONELLOSI ASSOCIATO AD ATTIVITÀ PROFESSIONALE**

La Malattia dei Legionari, da quando è stata scoperta, è stata spesso riscontrata in ambito occupazionale. I lavoratori esposti a questa patologia sono tutti quelli sottoposti in maniera sistematica a impianti idrici di piccole, medie e grandi dimensioni, visto che le legionelle sono batteri acquatici, in grado di colonizzare efficientemente i sistemi costruiti dall'uomo per il proprio lavoro o per il benessere sul posto di lavoro. Tutto ciò potrebbe indurre a ritenere la legionellosi come un esempio di "Malattia Professionale", che colpisce questa cerchia di lavoratori. Visto l'importanza dell'argomento, in questi ultimi anni si è sviluppato un nuovo campo di ricerca che è quello "della valutazione e prevenzione del rischio" in ambito lavorativo. L'esigenza di una efficace tutela dei lavoratori ha indotto gli organi competenti dell'Stato a stilare il D.Lgs. 81/2008 (Testo Unico) che ha l'obiettivo del "miglioramento delle condizioni di sicurezza e salute nei luoghi di lavoro". L'attuazione di tali direttive ha permesso di avvalersi di una nuova strategia prevenzionistica, incentrata sulla ricerca di più elevati livelli di sicurezza e di confort lavorativi compatibili con l'attuale disponibilità di soluzioni tecnologiche. In merito alla legionellosi è fondamentale evidenziare se nell'ambiente lavorativo esista il rischio di esposizione dei lavoratori ad agenti biologici e quali siano le tecniche organizzative procedurali attuate o attuabili per evitarne l'esposizione. Nel Allegato XLVI del D.Lgs. 81/2008 la *Legionella pneumophila* e le alte specie patogene per l'uomo (*Legionella* spp.) sono classificate quali agenti biologici del gruppo 2 ossia come definito all'articolo 268 (Classificazione degli agenti biologici) "un agente che può causare malattie in soggetti umani e costituisce un rischio per i lavoratori; è poco probabile che si

propaghi nella comunità; sono di norma efficaci misure profilattiche o terapeutiche”. Nel caso sia identificabile una potenziale esposizione a *Legionella* si devono attuare tutte le misure di sicurezza necessarie. Il datore di lavoro deve valutare se esiste il rischio di esposizione dei lavoratori ad agenti biologici, individuare le misure tecniche, organizzative, procedurali attuate o da attuare per predisporre i necessari interventi di protezione (art. 18 del D.Lgs. 81/2008 e s.m.i.). Come esposto precedentemente, le torri di raffreddamento, gli impianti di condizionamento dell’aria, gli umidificatori, gli impianti per liquidi refrigeranti, docce e fontane sono le principali sorgenti di infezione da parte di legionella. Tutti gli impianti menzionati hanno caratteristica di formare aerosol che, se in effetti diffondono il batterio nell’ambiente circostante creano i presupposti per i casi di malattia. La manutenzione di questi impianti si basa su opere periodiche di pulizia (almeno due volte l’anno) e su ispezioni mensili, con prelevamento di campioni su cui attuare le analisi microbiologiche. Analizzando attentamente gli impianti implicati si può dedurre che quasi tutte le aree lavorative sono interessate dal problema *Legionella*, visto che molte industrie utilizzano dei liquidi refrigeranti e torri di raffreddamento e molte attività svolte in ufficio possono comportare esposizione agli impianti di condizionamento.

Sebbene esistano pochissimi casi in letteratura, si ritiene che gli addetti alla manutenzione o alla pulizia dei sistemi di smaltimento del calore di tipo umido (Wet Type Heat Rejection, WTHR) o altri dispositivi produttori di aerosol siano da ritenersi lavoratori ad alto rischio di esposizione per le legionelle (Linee Guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi, Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Provincie Autonome di Trento e Bolzano). Per questi soggetti la più valida misura di prevenzione è costituita dall’uso di maschera respiratoria dotata di filtro HEPA o di “tipo H” ad alta efficienza. I filtri in grado di trattenere aerosol,

nebbie, particolati, particelle di amianto, ecc., dovrebbero essere in grado di assicurare una adeguata protezione nei confronti di *Legionella*. L'uso di maschera è particolarmente raccomandato nelle operazioni di pulizia basate sull'impiego di vapore, acqua o aria ad alta pressione o su altri mezzi che possono generare aerosol. Per gli addetti alla decontaminazione, inoltre, si raccomandano misure di protezione aggiuntive come guanti di gomma, occhiali, e tute protettive. Per quanto riguarda gli operatori sanitari di assistenza, visto che la trasmissione della malattia da persona a persona non è mai stata dimostrata, per questa categoria di lavoratori il rischio di contrarre la legionellosi si riduce ai casi in cui avvenga l'inalazione di aerosol contaminato (ad esempio durante operazioni che riguardano l'igiene personale del paziente con utilizzo di acqua) al quale peraltro sono esposti anche i pazienti. Tale evento si configura come poco probabile se la struttura sanitaria si è dotata di un programma di controllo del rischio legionellosi correlata all'assistenza ed alla luce del più ridotto grado di suscettibilità all'infezione da parte di individui con sistema immunitario integro (in particolare in assenza di fattori predisponenti). All'opposto, i tecnici della prevenzione addetti agli interventi di ispezione, controllo e campionamento degli impianti idrici e impianti capaci di generare aerosol potenzialmente contaminati, devono ritenersi a maggior rischio di esposizione alla *Legionella*. Le aziende sanitarie, valutati i rischi espositivi, individueranno i dispositivi di protezione individuale (DPI) necessari, da fornire agli operatori preposti alle attività in questione per minimizzare il rischio da *Legionella* o i rischi di natura non microbiologica, come ad esempio ustioni, lesioni da acqua in pressione, ecc. I dispositivi di protezione individuale sono rappresentati quindi da facciali filtranti per la protezione delle vie respiratorie (maschera filtrante di tipo FFP2 o FFP3 (filtering face piece), che permettono di ridurre l'inalazione degli aerosol rispettivamente del 95% e del 98%; guanti, occhiali e tute per la protezione

da ustioni e/o schizzi .Gli operatori devono essere addestrati al corretto utilizzo dei DPI e disporne in quantità e taglia adeguata.

Secondo alcuni studi, un'altra classe di lavoratori a rischio di legionellosi è quella del personale odontoiatrico. IL rischio di malattia è molto alto in campo odontoiatrico, a causa della presenza di *L.pneumofila* nell'impianto idrico, con formazione di aerosol per il raffreddamento dei trapani (Szymanska, 2004). Il rischio potrebbe ridursi con una adeguata manutenzione e disinfezione e facendo scorrere spesso l'acqua, anche tra un paziente e l'altro, annullando così la carica batterica creata nei punti morti dell'impianto (Szymanska, 2004). Altri ambienti di lavoro particolarmente esposti sono gli uffici. Ne è un esempio il caso avvenuto a San Francisco nella prima metà di marzo del 1980, in cui 14 impiegati hanno contratto la Malattia dei Legionari causata da *Legionella pneumophila* sierogruppo 1 (Conwill *et al.*, 1982). Altra categoria professionale a rischio di legionellosi è quella dei giardinieri . L'agente eziologico riscontrato con più frequenza nella legionellosi di questa classe di lavoratori è la *Legionella longbeachae*, una delle poche specie di legionella associate al suolo (Stojek and Dutkiewicz, 2002). A quanto pare il contatto con schizzi e getti d'acqua, che avviene in questo lavoro, è determinante per la trasmissione del batterio.

Sebbene in minor percentuale, si sono verificati casi di malattia legati a impianti idrici delle case; tali impianti avendo dimensioni ridotte, non offrono condizioni ottimali per la presenza del batterio. Da uno studio condotto a livello nazionale sulla diffusione di *Legionella* spp. nell'acqua calda delle abitazioni (Gruppo multicentrico di studio sulla legionellosi in Italia), è emerso che il 22,6% delle case è colonizzato da Legionella, con concentrazioni maggiori/uguali a 1.000 CFU/L nel 57,6% dei casi, e che la specie più diffusa è *L. pneumophila* (oltre l'80% dei campioni esaminati).

Lo studio dei fattori di rischio ha evidenziato che risiedere ai piani elevati di un condominio di grandi dimensioni, con un sistema di riscaldamento centralizzato e realizzato da più di dieci anni costituisce un rischio significativo per la colonizzazione ([www.legionellaonline.it](http://www.legionellaonline.it)). Quest'ultimo esempio non è legato di per se ad un ambito occupazionale, anche se l'ambiente domestico potrebbe essere considerato "luogo di lavoro" per una casalinga.

## Cap.6 – LEGIONELLA E LA SINDROME DA EDIFICIO MALATO

Nel 1968, una strana epidemia caratterizzata da febbre, mal di testa e dolori muscolari, colpì quasi tutti gli impiegati di alcuni uffici pubblici situati in un edificio di Pontiac, nel Michigan (USA). Dopo diverse ricerche si identificò la causa dell'epidemia in un batterio che aveva trovato un terreno di coltura adatto nei detriti trattenuti dai filtri del sistema di ventilazione, in cattivo stato di funzionamento (Robertson, 1987). Nel 1970, alcuni medici statunitensi notarono l'insorgere di alveoliti allergiche tra gli impiegati di uffici con aria condizionata: a tali sintomi, e a quelli suscitati dall'epidemia del 1968, si attribuì il nome di "Sindrome da Edificio Malato" (European Concerted Action, 1989; Bourbeau *et al.*, 1997).

La "Sindrome da Edificio Malato" è, perciò, il nome dato ad un insieme di sintomi che compaiono, principalmente, in coloro che lavorano in edifici con aria condizionata. Tale sintomatologia è stata, però, osservata anche in individui che lavorano in edifici ventilati naturalmente. La sindrome, la cui causa è probabilmente multifattoriale, non è usualmente accompagnata da lesioni organiche o manifestazioni fisiche ed è, quindi, diagnosticata per esclusione (European Concerted Action, 1989).

Nel 1976, in Philadelphia (USA), ci fu l'esplosione di una malattia infettiva sconosciuta, soprannominata la "Malattia dei Legionari". Questo morbo che colpì i polmoni, fu causato da un batterio sconosciuto, probabilmente sviluppatosi in una torre di raffreddamento adiacente al sistema di condizionamento di un hotel di Philadelphia dove si riunivano i membri della Legione dei Veterani dell'Esercito Americano. Perciò, al batterio fu dato il nome di *Legionella pneumophila*. In seguito si identificò con

*Legionella* lo stesso batterio che aveva causato l'epidemia di Pontiac del 1968 (Robertson, 1987).

Da allora, parecchie epidemie, con gli stessi sintomi, si sono verificate in differenti parti del mondo, tutte probabilmente causate da *Legionella*. Gli studi svolti a proposito hanno portato ad identificare la causa della contaminazione negli impianti di condizionamento: le temperature dell'acqua tra i 20 °C ed i 50 °C nelle torri di raffreddamento favoriscono lo sviluppo di *Legionella* e, grazie ai condotti, il batterio può diffondersi. Negli anni '80, dagli studi su *Legionella*, si è arrivati ad individuare come causa della "Sindrome da Edificio Malato" più di una dozzina di differenti tipi di batteri, oltre a *Legionella*, tra i quali anche *Stafilococco* spp. ed oltre due dozzine di funghi presenti nell'aria degli ambienti con impianti di ventilazione (Robertson, 1987).

Si è dedotto, poi, che una ventilazione inefficiente fosse il fattore principale per l'insorgere della "Sindrome da Edificio Malato".

Infatti, impianti di ventilazione con condotti degradati e serrande non funzionanti correttamente, anziché ricambiare l'aria, riciclano aria viziata e portatrice di batteri, gas nocivi, funghi ed altro materiale inquinante. La scarsa efficienza dei filtri determina sia una portata d'aria depurata insufficiente, che un livello eccessivo di CO<sub>2</sub>: possibili cause di spossatezza fisica. Infine, in queste condizioni le diverse parti che compongono l'impianto sono facilmente contaminate dalla crescita di microbi, funghi e germi.

I sintomi con cui la "Sindrome da Edificio Malato" si manifesta normalmente negli impiegati sono: mal di testa, sonnolenza, difficoltà di concentrazione, astenia, nausea, irritazione agli occhi, naso, gola, problemi respiratori, eruzioni cutanee, secchezza ed irritazione della gola.

Studi effettuati negli Stati Uniti dal *National Institute of Occupational Safety and Health* (NIOSH) tra gli anni '80 e '90, hanno rivelato che il 50%



dei problemi di salute degli impiegati negli Stati Uniti è dovuto proprio ad una ventilazione inadeguata o mal funzionante.

Tale problema è all'origine del 50% delle assenze dal lavoro, con conseguenze facilmente intuibili anche sul piano dei costi sociali (Robertson, 1987; Bourbeau *et al.*, 1997).

Nel 1989, in Europa, l'*European Concerted Action* ha pubblicato i risultati degli studi effettuati per determinare i fattori di rischio nell'insorgere della "Sindrome da Edificio Malato" e quindi, necessariamente da tenere sotto controllo:

-fisici: temperatura (deve rimanere tra 20 °C- 26 °C); umidità relativa (non deve superare il 70%); ventilazione (deve garantire un efficiente ricambio d'aria: circa 30 m<sup>3</sup>/h per persona sedentaria non fumatrice); luce artificiale; rumore e vibrazioni; ioni; particelle e fibre;

-chimici: fumo di tabacco ambientale; formaldeide; composti organici volatili; biocidi; altre sostanze gassose (CO<sub>2</sub>, CO, NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>); odori;

-biologici: microrganismi patogeni;

-fisiologici: memoria; vigilanza; tempo di reazione; suscettibilità; stress.

Negli anni '90, sono stati effettuati numerosi studi per scoprire i meccanismi coinvolti nello scaturire della "Sindrome da Edificio Malato" (Bourbeau *et al.*, 1997): sono state associate tra loro determinate componenti e si è osservato un incremento dei sintomi della sindrome in presenza di precisi fattori:

- personali (allergie ed asma, sesso femminile);

- sociali e psicologici (stress ed insoddisfazione al lavoro);

- componenti dell'ambiente lavorativo (presenza di tappeti, uso di videotermini, illuminazione, rumore, comfort, impianti di condizionamento dell'aria).

Dalle varie ricerche, si è dedotto che i rimedi alla "Sindrome da Edificio Malato" sono soprattutto di carattere preventivo: pulizia e controllo

programmato dei sistemi di ventilazione; verifica della qualità dell'aria e dell'entità dei fattori di rischio ambientale, sia chimici che biologici (Delussu, 1987); diluizione con aria esterna; visite mediche periodiche mirate ai lavoratori sulla base delle normative vigenti e/o da definirsi; questionari proposti ai lavoratori per rimuovere all'origine i rischi che alterano la salute dei lavoratori (Delussu, 1987).

Alla fine degli anni '90, sulla base degli studi collegati alla "Sindrome da Edificio Malato", si è iniziato a diagnosticare un'altra patologia, o meglio un quadro patologico particolare: la "Sindrome da Sensibilità Chimica Multipla", anch'essa legata agli inquinanti che portano allo scaturire della "Sindrome da Edificio Malato". Tale quadro patologico è caratterizzato da reazioni negative dell'organismo ad agenti chimici ed ambientali presenti in concentrazioni generalmente tollerate dalla maggior parte delle persone (AA.VV., 2002). Dopo la scoperta della "Sindrome da Edificio Malato" e della "Sindrome da Sensibilità Chimica Multipla", alla fine degli anni '90, si inizia a parlare di "Malattie associate agli edifici" ed a porre sempre maggiore attenzione alla situazione qualitativa dell'aria degli ambienti interni.

Le "Malattie associate agli edifici" includono tutte quelle patologie che hanno un quadro clinico ben definito e per le quali può essere identificato uno specifico agente causale presente nell'ambiente confinato (AA.VV., 2002). Tra gli agenti sono compresi tutti quelli che possono far scaturire la "Sindrome da Edificio Malato" e la "Sindrome da Sensibilità Chimica Multipla": agenti biologici, chimici e fisici (polveri, formaldeide, radon, amianto, ecc.).

Gli effetti sulla salute umana riguardano:

- apparato respiratorio: asma, bronchiti, malattie respiratorie, legionellosi, alveoliti allergiche, ecc.;
- cute e mucose: irritazioni, dermatiti atopiche, sensibilizzazione, ecc.;

- sistema nervoso: cefalee, sonnolenza, vertigini, astenia, ecc.;
- sistema immunologico: reazioni allergiche, febbre, febbre da umidificatori; etc.

Nell'ultima quindicina di anni, gli studi sono stati particolarmente orientati verso i possibili effetti cancerogeni di alcuni inquinanti chimici ed al rischio correlato alla presenza negli ambienti interni di inquinanti con dimostrata evidenza di cancerogenità.

I principali agenti cancerogeni che possono essere presenti negli ambienti interni sono:

- fumo di sigaretta (attivo e passivo);
- radon;
- amianto;
- composti organici volatili (formaldeide, benzene e composti presenti nel fumo di tabacco).

Diverse ricerche hanno dimostrato che le persone che trascorrono molto tempo in ambienti confinati, dove sono presenti alcuni di questi agenti cancerogeni, sono significativamente esposte al rischio di cancro. Tale rischio incrementa notevolmente quello complessivo della popolazione generale (AA.VV., 2002).

## Cap.7 – SCOPO

Il presente studio è stato condotto allo scopo di analizzare la validità delle procedure per il contenimento e la gestione del rischio idrico adottate in un ospedale di rilievo nazionale. In particolare si prende in esame una Azienda Ospedaliera che ha messo in atto una strategia per la prevenzione e il controllo della legionellosi, basata sulla stesura di un programma di sorveglianza ambientale. Nel corso di tale sorveglianza è emersa più volte la necessità di effettuare interventi di bonifica.

In un ottica di miglioramento continuo si è effettuato uno studio della durata di cinque anni intrapreso a partire dal gennaio 2008 che prevede la valutazione dell'efficacia dei sistemi di bonifica per il controllo della contaminazione da *Legionella*.

Nel corso di questi anni pertanto sono state applicate e valutate nel tempo diverse tipologie di interventi di disinfezione.

In particolare gli obiettivi di tale studio sono stati i seguenti:

- La determinazione della entità della contaminazione da *Legionella* spp. prima e dopo gli interventi di bonifica concepiti.
- La valutazione a lungo termine dell'efficacia delle misure di controllo applicate.
- La distribuzione dei diversi sierogruppi di *L.pneumophila*.

## Cap.8 –MATERIALI E METODI

### 8.1 Punti di prelievo e modalità di campionamento

Sono stati presi in esame i risultati delle analisi condotte su prelievi effettuati tra il 2008 e il 2012 (estesi fino al primo semestre 2013) in UU. OO. ubicate in diversi edifici dei Presidi Ospedalieri A e B, nei quali sono applicate misure di controllo della contaminazione microbica della rete idrica. La strategia di controllo del rischio idrico ha previsto l'installazione di generatori di biossido di cloro nonché l'installazione di sistemi filtranti al punto d'uso nelle aree ospitanti pazienti giudicati a maggior rischio.

Il campionamento dell'acqua per la ricerca di *Legionella*, deve essere eseguito in un numero di siti che sia rappresentativo di tutto l'impianto idrico, e comunque in almeno sei punti.

I punti da cui effettuare il campionamento sono: la rete dell'acqua fredda (serbatoio dell'acqua e il punto più distale dal serbatoio), la rete dell'acqua calda (serbatoio dell'acqua calda vicino alle valvole di scarico e il ricircolo dell'acqua calda) e almeno due siti di erogazione lontani (punti terminali) dal serbatoio dell'acqua calda (docce, rubinetti).

I punti di campionamento ritenuti più rappresentativi e da cui, sostanzialmente, non si può prescindere per la valutazione di un impianto idrico sono:

1. collettore di uscita dell'acqua calda sanitaria dal serbatoio o dal bollitore (collettore normalmente indicato con il termine "mandata") – Il prelievo sulla mandata deve essere effettuato prima di ogni eventuale miscelazione;
2. collettore di ritorno dell'acqua calda sanitaria (collettore normalmente indicato con il termine "ricircolo");
3. fondo dei serbatoi di accumulo e degli scaldacqua anche elettrici; in tali serbatoi si possono depositare masse consistenti di calcare all'interno delle

quali la temperatura dell'acqua è relativamente più bassa e conseguentemente viene favorita la "colonizzazione" e la proliferazione della *Legionella*;

4. tratti particolari delle tubazioni secondarie poco utilizzate o tratti terminali non connessi a sistemi di ricircolo (detti rami morti). In questi tratti di tubazione è possibile la formazione di un consistente strato di biofilm nel quale può nidificare e proliferare la *Legionella*; se questi punti di erogazione sono poco usati è consigliabile eliminarli o vietarne l'accesso all'utenza;

5. punti di erogazione più vicini e più distali rispetto al sistema di produzione dell'acqua calda sanitaria: soffioni delle docce e/o doccette di vasche da bagno ovvero da rubinetti di lavabo, sistemi rompigetto, tubi in gomma con doccia a telefono, aeratori, ugelli.

Altri punti di prelievo possibili sono:

- acqua di umidificazione, di condensa e acqua di sifoni ed altre;
- parti degli impianti per l'aria condizionata (filtri o parti di essi);
- acqua in entrata e in uscita dagli addolcitori;
- acqua proveniente da sgocciolamento dalle torri di raffreddamento;
- acqua della vasca di raccolta delle torri di raffreddamento;
- serbatoi di accumulo dell'acqua fredda;
- fontane decorative.

Le modalità di prelievo sono state quelle descritte nelle linee-guida italiane (Documento di linee-guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi 2000): per ogni punto d'uso è stata fatta scorrere l'acqua per 5 minuti e successivamente si è raccolto un litro di acqua all'interno di un recipiente sterile, aggiungendo 0,5 ml di una soluzione 0,1 N di tiosolfato di sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) allo scopo di neutralizzare il cloro libero residuo. I prelievi sono stati eseguiti evitando la formazione di aerosol; sono stati utilizzati

appropriati dispositivi di protezione individuale (D.P.I) previsti nel documento di valutazione del rischio.

I campioni sono stati conservati al buio, a temperatura ambiente, processati entro le 24h dal prelievo. In corrispondenza del prelievo è stata anche misurata la temperatura dell'acqua calda e fredda al punto d'uso con termometro digitale ed è stata determinata la concentrazione del cloro totale del cloro libero residuo mediante metodo colorimetrico con kit Visocolor HE (Macherey-Nagel, Düren, Germany) (Figura 4) e la concentrazione del cloro combinato (differenza tra cloro totale e cloro residuo libero).



**Fig.4 - Kit analitico Visocolor HE Cloro**

Il cloro libero residuo o attivo è quello che agisce come ossidante quindi totalmente disponibile per la disinfezione. Per la inattivazione e soppressione di *Legionella* è richiesta una concentrazione costante di cloro libero residuo compresa tra 1 e 3 mg/l.

Il cloro totale è l'insieme di tutte sostanze a base di cloro presenti nell'acqua.

## 8.2 Analisi dei campioni ed isolamento di *Legionella* spp.

E' stata ricercata nei campioni la presenza di *Legionella* facendo riferimento al protocollo indicato nelle linee guida italiane e alla norma ISO 11731 (ISO 11731 1998). Ogni campione da un litro di acqua è stato concentrato mediante filtrazione attraverso una membrana con porosità di 0,2 µm di diametro (Millipore, Billerica, MA); tale membrana è stata poi immersa in 10 ml del campione iniziale. Dopo agitazione, la sospensione è stata sottoposta ad una fase di inattivazione termica, esponendola a 50°C per 30 minuti, per rendere il procedimento selettivo per *Legionella* spp. Dunque sono stati prelevati 100µl della sospensione, sia in toto sia diluita 1:10 e 1:100, e sono stati seminati su terreno di coltura GVPC (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK). Le piastre sono state incubate a 37°C per 10 giorni all'interno di giare nelle quali è stato creato un ambiente umido con un tenore di CO<sub>2</sub> pari al 2,5%. Sui campioni positivi, nei quali si fosse evidenziata la crescita microbica, le colonie sono state sottoposte ad un test di agglutinazione polivalente su lattice (*Legionella* latex test, Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK), metodica con la quale è possibile identificare ceppi di *Legionella pneumophila* sierogruppo 1, ceppi di *L. pneumophila* sg. 2-14 ed inoltre 7 tra le specie di *Legionella* diverse da *L. pneumophila* più frequentemente implicate nella patologia umana (si tratta di *L. anisa*, *L. bozemanii* 1 e 2, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. longbeachae*, *L. micdadei*).



## Cap.9 –RISULTATI E DISCUSSIONI

L'Azienda Ospedaliera in esame è divisa in due Presidi, denominati arbitrariamente A e B, e rientra nella tipologia a padiglioni.

Dal 2003 nella Azienda sono iniziati i controlli routinari sull'acqua calda sanitaria per la ricerca di *Legionella* spp. attraverso l'effettuazione di prelievi su tutti i punti di studio individuati con frequenza periodica e in base all'attuazione dei metodi di disinfezione.

Il presente studio analizza i risultati delle bonifiche effettuate sui punti critici scoperti nel corso della sorveglianza ambientale a partire dal gennaio 2008.

La strategia di gestione del rischio ha previsto provvedimenti di disinfezione della rete idrica mediante biossido di cloro dal ottobre 2003.

Sono stati studiati entrambi i presidi ospedalieri nonché i singoli padiglioni appartenenti ai rispettivi presidi. In particolare i padiglioni sottoposti a controllo sono quelli i cui reparti sono considerati a rischio per la presenza di degenti con patologie debilitanti o sottoposti a terapie immunosoppressive.

I risultati di monitoraggio ambientale hanno rilevato la presenza di *L.pneumophila* in tutti gli edifici dei due presidi ospedalieri (Presidio A Tabella 5, Presidio B Tabella 6).

**Tab.5** - Numero totale osservazioni, numero campioni positivi (con relative percentuali) e UFC/L di *L. pneumophila* rilevate nel periodo fra il 2008 e il primo semestre del 2013 nel Presidio A.

Anno	Numero osservazioni	Positivi	<1000	≥1000≤10000	> 10000
2008	181	52(28,72%)	4(7,69%)	15(28,85%)	33(63,46%)
2009	141	17(12,05%)	2(11,76%)	3(17,65%)	12(70,59%)
2010	122	21(17,21%)	4(19,05%)	5(23,81%)	12(57,14%)
2011	184	31(16,84%)	7(22,58%)	12(38,71%)	12(38,71%)
2012	189	54(28,57%)	4(7,41%)	26(48,15%)	24(44,44%)
2013	103	59(57,28%)	1(1,69%)	25(42,37%)	33(55,93%)

Nel corso del 2008 nel **Presidio A** sono stati effettuati 181 campionamenti sull'acqua calda sanitaria:

- 52 campioni sono risultati positivi (28,72%).
- La maggior parte dei campioni positivi era contaminato dal sierogruppo 1.
- 33 campioni positivi (63,46%) superava la concentrazione di 10.000 UFC/L.

Nel corso del 2009 sono stati effettuati 141 campionamenti sull'acqua calda sanitaria:

- 17 campioni sono risultati positivi (12,05%).
- La maggior parte dei campioni positivi era contaminato dal sierogruppo 1.
- 12 campioni positivi (70,59%) superava la concentrazione di 10.000 UFC/L.

Nel corso del 2010 sono stati effettuati 122 campionamenti sull'acqua calda sanitaria:

- 21 campioni sono risultati positivi (17,21%).
- La maggior parte dei campioni positivi era contaminato dal sierogruppo 1.
- 12 campioni positivi (57,14%) superava la concentrazione di 10.000 UFC/L.

Nel corso del 2011 sono stati effettuati 184 campionamenti sull'acqua calda sanitaria:

- 31 campioni sono risultati positivi (16,84%).
- La maggior parte dei campioni positivi era contaminato dal sierogruppo 1.
- 12 campioni positivi (38,71%) superava la concentrazione di 10.000 UFC/L.

Nel corso del 2012 sono stati effettuati 189 campionamenti sull'acqua calda sanitari:

- 54 campioni sono risultati positivi (28,57%).
- La maggior parte dei campioni positivi era contaminato dal sierogruppo 1.
- 24 campioni positivi (44,44%) superava la concentrazione di 10.000 UFC/L.

Nel corso del primo semestre 2013 sono stati effettuati 103 campionamenti sull'acqua calda sanitaria:

- 59 campioni sono risultati positivi (57,28%).
- La maggior parte dei campioni positivi era contaminato dal sierogruppo 1.
- 33 campioni positivi (55,93%) superava la concentrazione di 10.000 UFC/L.

Per la valutazione e l'interpretazione dei risultati delle diverse analisi effettuate è opportuno riferirsi alle attuali linee guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi predisposte dal Ministero della Sanità. Secondo tali linee guida la valutazione del rischio di contrarre la malattia è suggerita dalle seguenti concentrazioni:

- Presenza di una concentrazione di *Legionella* minori o uguali a 100 UFC/L (assenza di casi accertati di legionellosi nosocomiale): contaminazione limitata, non è necessario nessun intervento.
- Presenza di una concentrazione di *Legionella* compresa tra 1.000 e 10.000 UFC/L (assenza di casi accertati di legionellosi nosocomiale): contaminazione presente, aumentare sorveglianza clinica, adottare le misure

specifiche di prevenzione e controllo indicate nelle linee guida, ripetere periodicamente i controlli batteriologici.

- Presenza di una concentrazione di *Legionella* compresa tra 0 e 10.000 UFC/L (presenza di almeno un caso accertato di legionellosi nosocomiale): oltre a quanto esposto sopra a effettuare la bonifica ambientale.

- Presenza di una concentrazione di *Legionella* maggiore 10.000 UFC/L (indipendentemente dalla presenza di casi accertati di legionellosi nosocomiale): contaminazione massiva, attuare immediatamente procedure di decontaminazione a rapida azione: shock termico o iperclorazione.

In assenza di casi, quando la concentrazione di batteri rilevata è compresa tra 100 e 1.000 UFC/L, dalle linee guida nazionali non è chiaro come comportarsi; comunque per valori superiori a 100 UFC/L per controllare il fenomeno, conviene attuare le misure di sorveglianza clinica ed interventi di manutenzione.

Inoltre le attuali linee guida di riferimento non indicano le percentuali di campioni positivi che costituisce la soglia oltre la quale è necessario implementare i livelli di intervento. Spesso in letteratura, viene indicato che quando il numero di campioni positivi supera il 30% dei campioni effettuati, anche in assenza di casi accertati di legionellosi nosocomiale è necessario attivare tutte le misure di prevenzione previste nel caso di presenza di contaminazione.

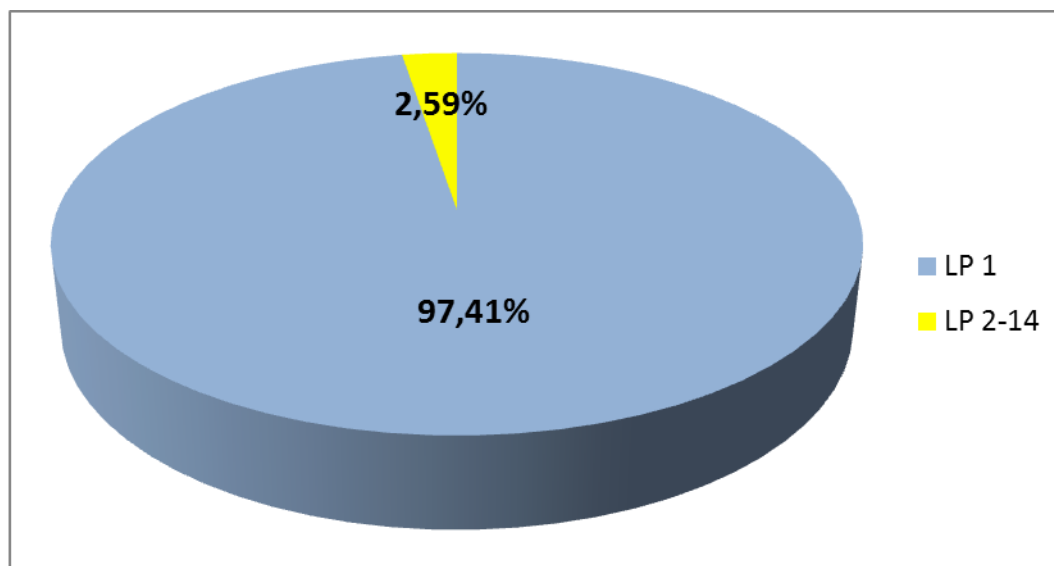
A partire dalla fine del 2007 nel presidio A, sulla base della mancata eradicazione della colonizzazione microbica, legata a diversi fattori (problematiche strutturali, eventi accidentali, etc.), sono stati associati tra loro diversi interventi di bonifica a medio e lungo termine. La strategia è stata integrata con provvedimenti di filtrazione dopo valutazione del rischio intrinseco delle popolazioni di pazienti ospitanti. L'installazione di sistemi filtranti ha riguardato i punti d'uso nei padiglioni i cui reparti sono considerati ad alto rischio così come riportato nelle linee guida.

I risultati delle analisi condotte sulla totalità dei prelievi dimostrano come l'approccio integrato sia stato in grado di ridurre la percentuale di campioni positivi che superava la concentrazione di 10.000 UFC/L , indice di contaminazione importante. I risultati dei controlli effettuati nel corso del primo semestre del 2013 mostrano invece un incremento della percentuale di campioni positivi che supera la concentrazione di 10.000 UFC/L . Questo dato è da imputare ai numerosi lavori effettuati sulla rete idrica del presidio A iniziati a dicembre 2012 che hanno comportato un non ottimale funzionamento dei dispositivi impiegati per il trattamento addizionale dell'acqua. A partire dal mese di agosto di quest'anno, ultimati i lavori e immessi i nuovi dispositivi è prevedibile ipotizzare una diminuzione della percentuale dei campioni positivi e là dove persistano un decremento del numero di UFC/L di *Legionella* spp.

Infatti i campionamenti eseguiti nei mesi di agosto e settembre stanno confermando quanto sopradetto.

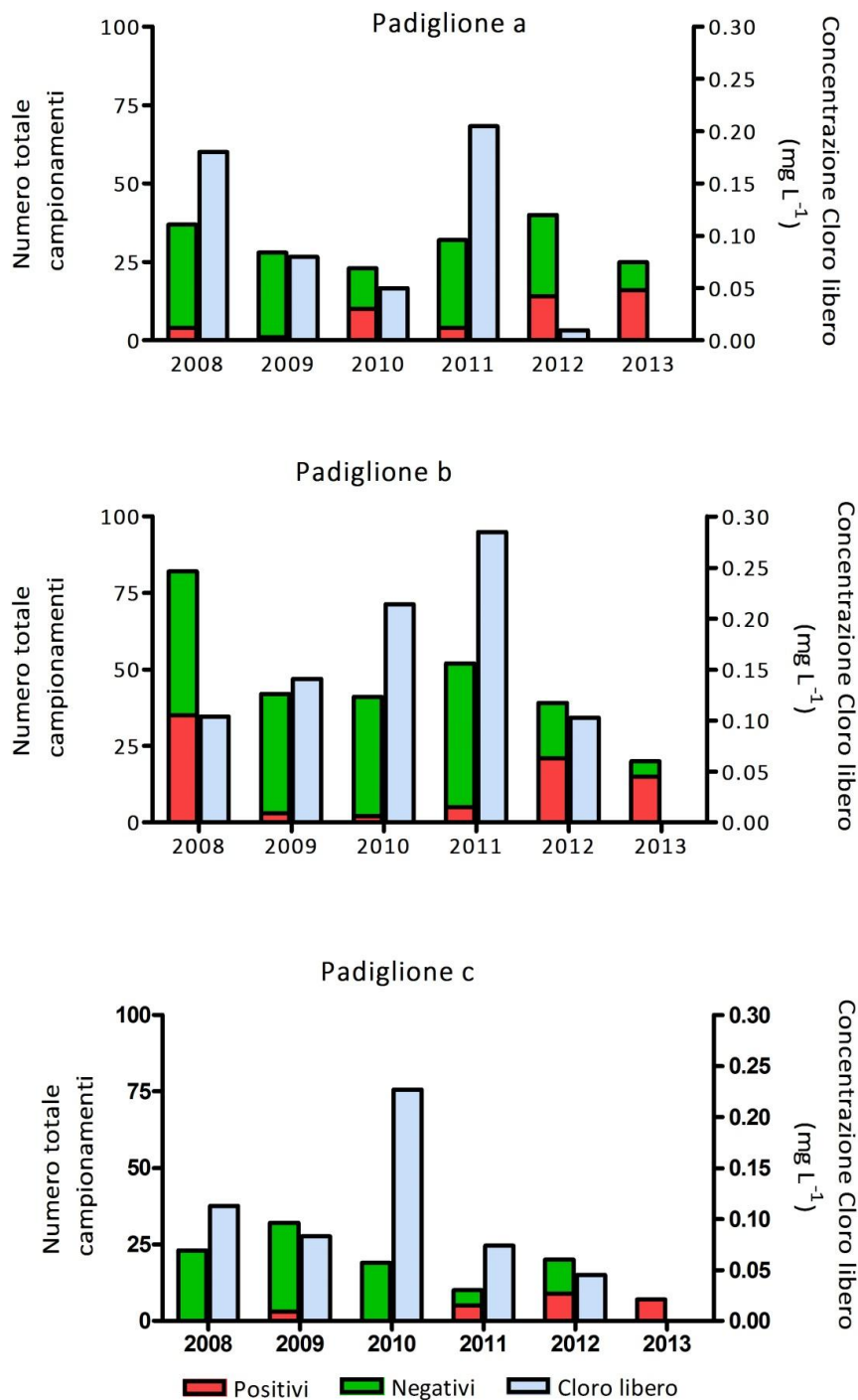
Per quanto concerne poi la distribuzione dei vari sierogruppi è stato osservato che la contaminazione praticamente è mono-microbica, con una prevalenza del 97,41% di *L.pneumophila* sierogruppo 1 (Figura 5).

In letteratura è stata riportata la possibilità di sviluppare nel tempo una resistenza al cloro da parte della *Legionella pneumophila* sierogruppo 1.



**Fig.5** – Prevalenza dei siero gruppi di *L. pneumophila* nel Presidio A.

Sono stati inoltre presi in considerazione tre padiglioni denominati a, b, c appartenenti al presidio A, i cui reparti ospitano degenti con fattori di rischio specifici (patologie croniche debilitanti e immunodepressione), quindi pazienti particolarmente suscettibili alla espressione clinica dell'infezione. I reparti sono stati dotati di sistemi filtranti i punti d'uso. Nelle analisi viene considerato non solo il numero di campioni positivi ma è valutata anche la concentrazione media in mg/L di cloro libero (attivo o residuo) nell'acqua calda sanitaria (Figura 6), il cloro libero rappresenta quello totalmente disponibile per la disinfezione.



**Fig. 6 a,b,c** – Numero totale di campionamenti, numero campioni positivi e negativi e concentrazione del cloro libero ( $\text{mg L}^{-1}$ ) in acqua calda nei tre padiglioni del presidio A (a, b, c) nel periodo compreso tra gennaio 2008 e il primo semestre del 2013.

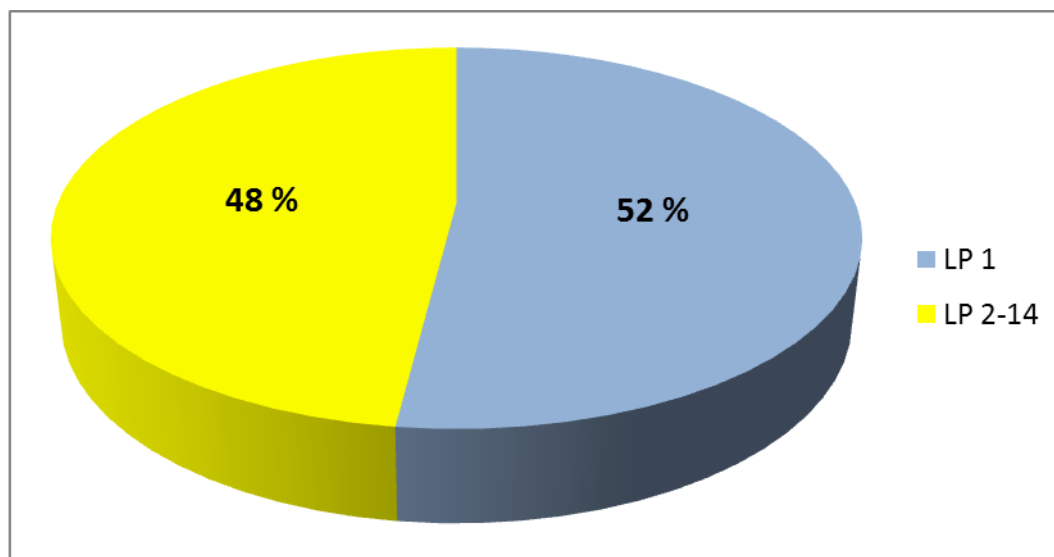
Infatti, quando il cloro viene aggiunto all'acqua per la disinfezione, solitamente inizia a reagire con composti organici e inorganici disciolti nell'acqua andando a formare il così detto cloro combinato. La quantità di cloro usata durante questo processo viene indicata come "richiesta di cloro dell'acqua". Il cloro può reagire con l'ammoniaca, formando le clorammine, composti chimici che contengono un atomo di cloro, di azoto e idrogeno. Queste sostanze vengono indicate come composti di cloro attivi (al contrario dell'acido ipocloridrico ed ipoclorito, che vengono indicati come cloro attivo libero). Tuttavia, pur essendo una forma di cloro attivo, hanno un'efficacia ossidante inferiore del cloro libero e rispetto a questo reagiscono molto più lentamente. L'obiettivo è quello di raggiungere una concentrazione media stabile nel tempo di cloro libero pari a 0,2 mg/l, valore che è in grado di garantire una buona qualità microbiologica dell'acqua oltre a rientrare nei limiti massimi nell'acqua potabile previsti dal D.Lgs 31/2001.

Dal grafico (Figura 6) si evince come all'aumentare del cloro libero diminuisca la percentuale di campioni positivi. Questo dato è anche sottolineato dai risultati dei campionamenti effettuati durante il primo semestre del 2013 nei diversi padiglioni, nel periodo in cui nella Azienda Ospedaliera venivano svolti lavori sul sistema idrico, periodo in cui non si è potuto garantire un ottimale funzionamento dei sistemi di bonifica. In tutti e tre i padiglioni la concentrazione media del cloro libero è risultata pari a 0,0 mg/l, infatti si è assistito a un incremento dei campioni positivi. Anche in questo caso, visto che i lavori sulla rete idrica sono stati ultimati e sono stati immessi i nuovi dispositivi, è prevedibile ipotizzare un aumento della concentrazione media di cloro libero e di conseguenza una diminuzione del numero di campioni positivi in accordo con il trend degli anni precedenti. Infatti i campionamenti eseguiti nei mesi di agosto e settembre stanno confermando quanto sopradetto.



I reparti sono stati dotati di sistemi filtranti i punti d'uso. Si utilizzano filtri monouso che contengono una membrana filtrante con porosità di 0,2 µm di diametro e che si applicano direttamente al punto d'uso (doccia, rubinetto). Il ridotto calibro dei pori del filtro permette che siano trattenuti nelle maglie della membrana anche batteri piccoli come *Legionella* spp, garantendo un'acqua di qualità molto elevata dal punto di vista microbiologico. L'associazione tra questi dispositivi e l'uso del biossido di cloro garantisce un'acqua priva di contaminazione da *L.pneumophila* e altri agenti batterici.

Per quanto concerne il **Presidio B** i risultati delle analisi sono in linea con quelli ottenuti nel Presidio A, visto che è stata usata una analoga strategia di gestione del rischio idrico. A differenza del Presidio A che mostrava una contaminazione praticamente mono-microbica da *L.pneumophila* sierogruppo 1 con una prevalenza del 97,41%, nel Presidio B si è riscontrata anche la presenza di *L.pneumophila* sierogruppo 2-14 (Figura 7).



**Fig.7** – Prevalenza dei sierogruppi di *L. Pneumophila* nel Presidio B

Nel corso del 2008 nel **Presidio B** sono stati effettuati 128 campionamenti sull'acqua calda sanitaria:

- 25 campioni sono risultati positivi (19,53%).
- un solo campione positivo (4%) superava la concentrazione di 10.000 UFC/L.

Nel corso del 2009 sono stati effettuati 123 campionamenti sull'acqua calda sanitaria:

- 32 campioni sono risultati positivi (26,02%).
- 5 campioni positivi (15,62%) superava la concentrazione di 10.000 UFC/L.

Nel corso del 2010 sono stati effettuati 101 campionamenti sull'acqua calda sanitaria:

- 25 campioni sono risultati positivi (24,75%).
- 2 campioni positivi (8%) superava la concentrazione di 10.000 UFC/L.

Nel corso del 2011 sono stati effettuati 87 campionamenti sull'acqua calda sanitaria:

- 27 campioni sono risultati positivi (31,03%).
- 4 campioni positivi (14,82%) superava la concentrazione di 10.000 UFC/L.

Nel corso del 2012 sono stati effettuati 125 campionamenti sull'acqua calda sanitari:

- 26 campioni sono risultati positivi (20,8%).
- 13 campioni positivi (50%) superava la concentrazione di 10.000 UFC/L.

Nel corso del primo semestre 2013 sono stati effettuati 73 campionamenti sull'acqua calda sanitaria:

- 41 campioni sono risultati positivi (56,16%).
  - 7 campioni positivi (17,07%) superava la concentrazione di 10.000 UFC/L
- (Tabella 6).

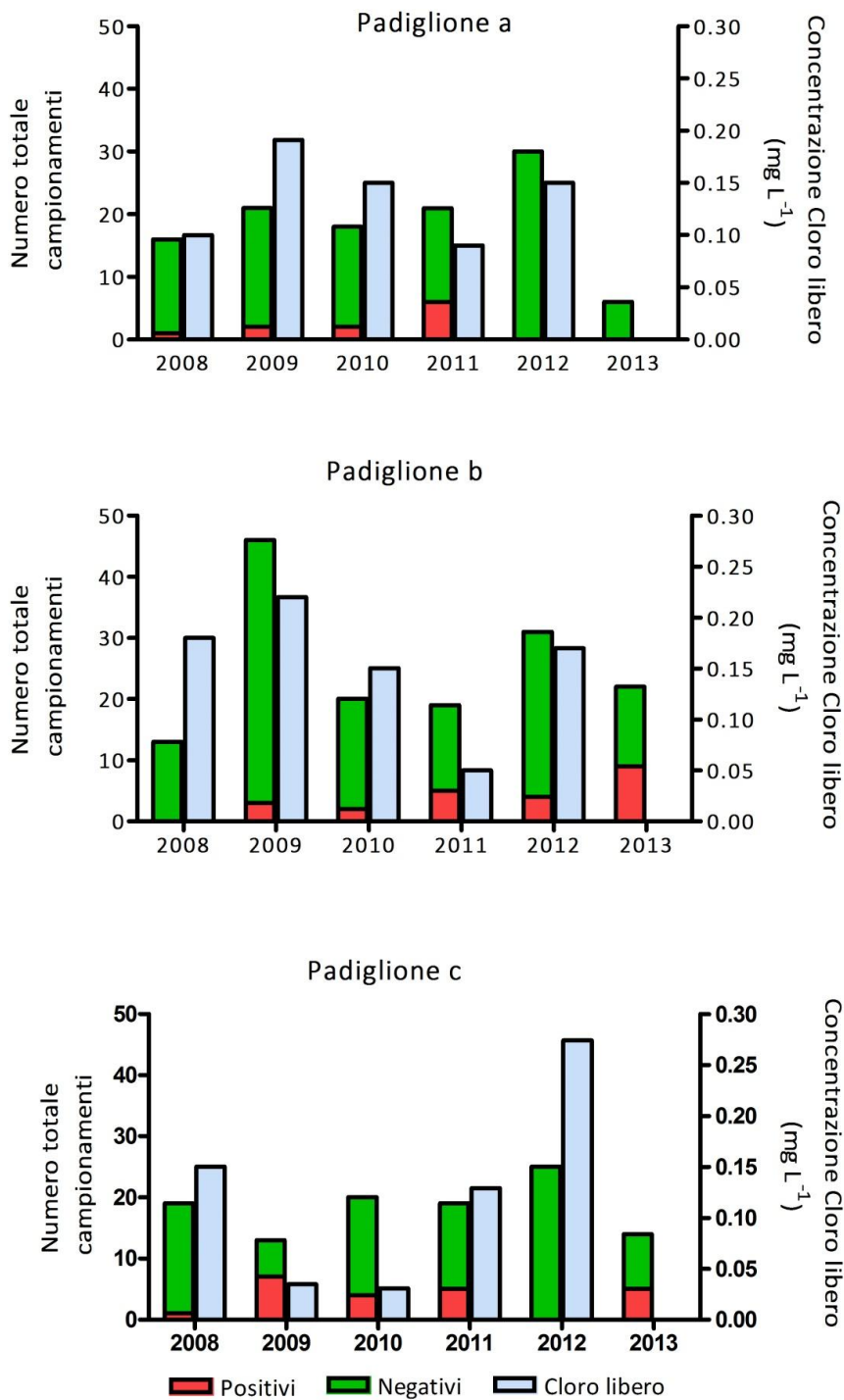
**Tab.6** - Numero totale osservazioni, numero campioni positivi (con relative percentuali) e UFC/L di *L. pneumophila* rilevate nel periodo 2008-2013 nel Presidio B.

Anno	Numero osservazioni	Positivi	<1.000	≥1000≤10000	> 10000
2008	128	25(19,53%)	8(32%)	16(64%)	1(4%)
2009	123	32(26,02%)	6(18,75%)	21(65,63%)	5(15,62%)
2010	101	25(24,75%)	9(36%)	14(56%)	2(8%)
2011	87	27(31,03%)	11(40,74%)	12(44,44%)	4(14,82%)
2012	125	26(20,8%)	1(3,85%)	12(46,15%)	13(50%)
2013	73	41(56,16%)	6(14,64%)	28(68,29%)	7(17,07%)

Nel Presidio B i lavori sull'impianto idrico sono iniziati sempre nel 2012 ma alcuni mesi prima di quelli sul Presidio A.

Nel corso del 2012 rispetto al 2011 non sono aumentate le percentuali di campioni positivi che anzi sono diminuite (31,03% nel 2011 contro il 26,8% nel 2012) ma è incrementata la percentuale dei campioni positivi che superava la concentrazione di 10.000 UFC/L (14,82% nel 2011 contro il 50% nel 2012). Anche per il presidio B è ipotizzabile, come per il Presidio A, che prossimamente, visto che i lavori sull'impianto idrico sono terminati, si assista a una diminuzione sia del numero di campioni positivi (nel primo semestre del 2013 sono risultati essere il 56,16%) che del numero delle UFC/L di *Legionella* (che comunque nel periodo in questione mostrano già un decremento risultando il 17,07% dei campioni positivi).

Anche per il Presidio B sono stati effettuati campionamenti su tre padiglioni (a, b, c,) i cui reparti parimenti ai padiglioni dell'edificio A, ospitano degenti con analoghi fattori di rischio. Dall'analisi dei dati anche in questo caso la correlazione tra numero di campioni positivi e il valore del cloro libero ha evidenziato come all'aumentare del disinfettante diminuisca significativamente la presenza di *L.pneumophila* (Figura 7).



**Fig.7 a,b,c** – Numero totale di campionamenti, numero campioni positivi e negativi e concentrazione del cloro libero (mg L<sup>-1</sup>) in acqua calda nei tre padiglioni del presidio A (a, b, c) nel periodo compreso tra gennaio 2008 e il primo semestre del 2013.

La mancanza di campioni positivi nel padiglione 1 durante il primo semestre 2013 è attribuibile a una attenta e accurata manutenzione dei dispositivi filtranti impiegati che se pur impegnativa e dispendiosa ha garantito l'assenza di *L.pneumophila* nonostante la concentrazione del cloro libero sia risultata essere pari a 0,0 mg/L.

Dall'analisi dei dati relativi alle indagini effettuate in entrambi i presidi, si nota un particolare andamento altalenante della percentuale dei campioni positivi così come le concentrazioni del batterio.

Non è stato facile associare la variazione della carica contaminante agli effetti della bonifica dato che la *Legionella* è in grado di colonizzare il biofilm e di replicarsi all'interno dell'amebe, inoltre la difficoltà nella valutazione dei dati sicuramente è anche dovuta alla non precisa conoscenza del complessa rete idrica.

Dai risultati dei campionamenti si evidenzia come la concentrazione di *Legionella* si riduca sempre dopo l'intervento di procedure di bonifica, anche se poi con il tempo tende nuovamente ad aumentare. Possiamo affermare comunque che l'attuazione di un approccio di tipo integrato nella struttura esaminata risulti giustificato, essendosi dimostrato efficace nel diminuire il rischio idrico da *L.pneumopila*.

## Cap.10 – CONCLUSIONI

I risultati ottenuti da questi anni di sorveglianza si prestano ad una serie di considerazioni.

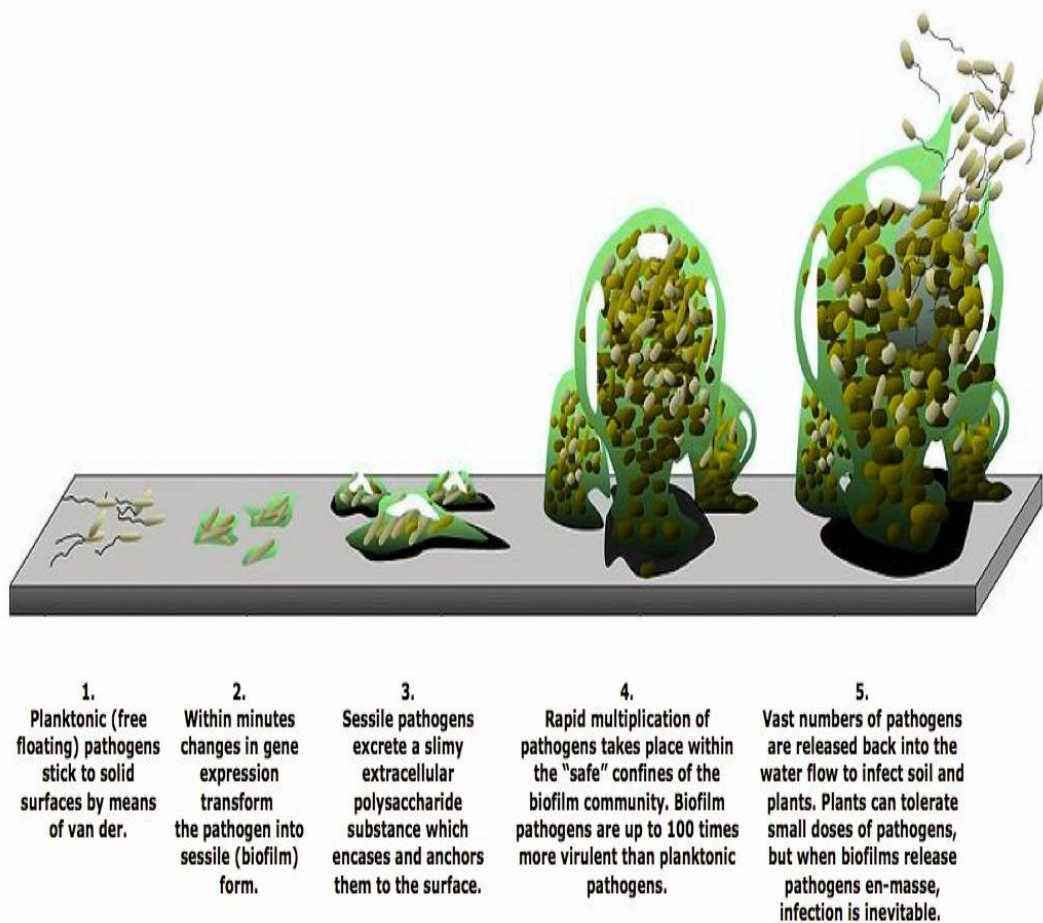
Il fatto che più o meno periodicamente dopo l'applicazione dei sistemi di bonifica la concentrazione di *Legionella* nei punti contaminati a volte torni a livelli elevati non deve meravigliare.

In effetti sono note le difficoltà che si incontrano quando si interviene su un sistema idrico complesso e articolato come quello dell'ospedale. In particolare gli impianti più vecchi sono ricchi di rami morti e spesso presentano sacche dove i mezzi di bonifica possono giungere con difficoltà.

La replicazione di *Legionella* all'interno dei protozoi inoltre assicura la sopravvivenza del batterio anche in condizioni avverse, quali variazioni di temperatura, osmolarità e PH; dopo la replicazione intracellulare il patogeno mostra una aumentata resistenza agli stress ambientali e ai biocidi. Da sottolineare in particolare è il fatto che negli impianti la *Legionella* può trovarsi non solo in forma libera ma anche ancorata a biofilm.

Il biofilm è un aggregato di batteri, polimeri, alghe e sali dove il batterio trova il supporto indispensabile per vivere e svilupparsi e dove può anche nascondersi rendendo inefficaci i trattamenti di disinfezione.

Il biofilm così sviluppa una vera e propria nicchia ambientale che mantiene la giusta idratazione, agisce come barriera meccanica contro gli stimoli lesivi esterni, intrappola nutrienti, altri microrganismi planktonici e materia inerte, come minerali o prodotti di corrosione (Lindsay, 2006). Il biofilm si sviluppa dove ci sono i necessari supporti di ancoraggio, sostanze nutritive, adeguate temperature: condizioni ad esempio che si possono trovare nelle torri evaporative o nei tubi che convogliano acqua calda a bassa velocità (velocità che non ostacolano con turbolenze l'ancoraggio e la crescita del biofilm ) (Figura 8).



**Fig. 8** - Formazione del biofilm su superficie solida

La presenza di biofilm, inoltre, può comportare errori rilevanti nel determinare i livelli di contaminazione degli impianti. Infatti durante le operazioni di misura i biofilm possono rompersi ( per forti sbalzi termici, improvvise turbolenze, urti meccanici ) e liberare grandi quantità di batteri che, di fatto, alterano in modo considerevole l'effettivo livello di contaminazione dell'impianto.

La *Legionella* occupa la maggior parte del volume del biofilm, mentre le cellule microbiche ne costituiscono solo il 5-25%. La produzione di tale matrice da parte delle cellule microbiche segue un meccanismo di

trasduzione del segnale intracellulare innescato dall'attivazione di recettori di membrana che fungono da "sensori", i quali inducono anche lo sviluppo di ponti intercellulari che ancorano le c

-

causa di problemi sanitari. Oltre ai batteri che partecipano alla biocorrosione, strettamente ambientali e non rilevanti dal punto di vista sanitario, tra i primi colonizzatori del biofilm sono segnalati microrganismi che fanno parte della flora microbica naturale delle acque, principalmente batteri pigmentati, a cui fanno seguito specie appartenenti ai generi *Flavobacterium*, *Arcobacter*, *Acinetobacter*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Bacillus*, attinomiceti e lieviti. Anche alcuni coliformi, come *Klebsiella pneumoniae*, sono spesso riscontrabili rispetto ad altre specie dello stesso gruppo, molto probabilmente perché hanno un maggior successo competitivo. Comunque, se sporadiche sembrano essere le evidenze associate alla presenza di microrganismi patogeni nelle acque potabili in distribuzione, soprattutto in Italia, diversi patogeni e opportunisti patogeni possono invece essere isolati dal biofilm (*Legionella*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, protozoi, micobatteri) che rappresenta quindi una fonte di diffusione di microrganismi, anche patogeni, nell'acqua.

IL biofilm mostra una marcata resistenza ai metodi di disinfezione dell'acqua e quindi l'associazione tra *Legionella* e biofilm, può almeno in parte, spiegare perché l'eliminazione del patogeno dagli impianti idrici.

Le legionelle sono in grado di sopravvivere anche in assenza di amebe ma in ogni caso la riproduzione intracellulare rimane la modalità preferita per la proliferazione del patogeno all'interno del biofilm, meglio se in presenza di un'alta concentrazione di batteri eterotrofi.



Tuttavia gli sforzi per ottenere la riduzione della contaminazione da parte di *Legionella* vanno ripetuti attuando nuovi interventi di bonifica associati tra loro nonché una periodica e adeguata manutenzione. Appare evidente che l'obiettivo generale nell'ambito di tale problematica sia quello di contenere il rischio e minimizzare i casi di legionellosi agendo prioritariamente sulle situazioni più critiche, sia con interventi preventivi che possono diminuire la presenza e la concentrazione di *Legionella*, sia con provvedimenti di controllo efficaci nel momento in cui si ha evidenza dei casi di malattia. Non si tratta pertanto di eradicare un germe, che, come è detto è ubiquitario, ma, più realisticamente di mettere in atto un sistema coordinato di interventi che fa leva sulla responsabilità di ciascun soggetto coinvolto nella progettazione, realizzazione, gestione, manutenzione e controllo di quegli impianti che possono essere a rischio di colonizzazione. Gli interventi di prevenzione e controllo devono essere mirati, efficaci ma anche sostenibili economicamente. L'eliminazione completa di *Legionella* dall'intero sistema di distribuzione dell'acqua in ospedale non è necessaria per minimizzare il rischio e non è spesso un obiettivo raggiungibile. Ciò non vale per i reparti che ospitano pazienti gravemente compromessi: in questo caso, l'interazione tra presenza di *Legionella* nell'acqua e l'incapacità del sistema immunitario di rispondere a eventuale esposizione rende necessari interventi atti a garantire l'assenza del batterio dall'acqua distribuita in queste aree assistenziali. La sorveglianza ambientale della *Legionella* resta una delle strategie di prevenzione del rischio di legionellosi più efficaci, soprattutto in strutture a rischio come gli ospedali per la tipologia delle persone ricoverate.

Essa consente infatti di monitorare nel tempo i livelli di contaminazione e applicare di volta in volta gli interventi di bonifica più appropriati. Come indicato in letteratura i metodi a disposizione per il controllo della

diffusione e moltiplicazione della *Legionella* negli impianti sono numerosi, tutti efficaci nel breve periodo ma non altrettanto a lungo termine.

Non esiste accordo in letteratura scientifica, né tra le diverse linee guida internazionali, sull'opportunità o meno di eseguire campionamenti ambientali periodici del sistema di distribuzione dell'acqua in tutto l'ospedale. Inoltre anche tra coloro che sostengono la necessità di effettuare un monitoraggio periodico dell'acqua, non vi è accordo sulla frequenza di campionamento. Quindi solo sperimentalmente è possibile trovare i sistemi più efficaci per ogni struttura specifica, che, attenendosi comunque alle indicazioni delle linee guida internazionali e nazionali (aggiornate anno per anno con le indicazioni derivate dall'esperienze delle singole regioni), tengano conto delle caratteristiche della struttura in cui si intende operare.

Ci sembra infine opportuno sottolineare che una delle armi preventive molto efficaci è rappresentata dalla informazione ed educazione del personale; tutti devono essere a conoscenza del problema e dei fattori che ne possono favorire l'insorgenza, poiché molto spesso gli eventi hanno come causa scatenante la trascuratezza nella manutenzione e l'ignoranza delle norme di prevenzione.

## Cap. 11 – BIBLIOGRAFIA

- Anassie EJ, Penzak SR, Dignani MC. The hospital water supply as a source of nosocomial infections. *Arch Intern Med* 2002; 162: 1483-1492.
- Annual epidemiological report on communicable diseases. ECDC 2012-2011.
- Aoki S, Hirakata Y, Miyazaki Y, Izumikawa K, Yanagihara K, Tomono K, Yamada Y, Tashiro T, Kohno S, Kamihira S. Detection of *Legionella* DNA by PCR of whole-blood samples in a mouse model. *J Med Microbiol* 2003; 52: 325-9.
- Armbruster CR, Forster TS, Donlan RM, O'Connell HA, Shams AM, Williams MM. A biofilm model developed to investigate survival and disinfection of *Mycobacterium mucogenicum* in potable water. *Biofouling* 2012; 2: 1129-39.
- Bailleul E, Magerman K, Mewis A, Peeters V, Rummens JL, Cartuyvels R. False-positive result with BinaxNOW *Legionella* Antigen immunochromatographic (ICT) assay: response to Helbig *et al.* *J Med Microbiol* 2004; 53: 173.
- Barker J, Brown MRW. Trojan Horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology* 1994; 140: 1253–1259.
- , Appenzeller BMR, Grandjean D, Fass S, Gauthier V, Jorand F, Mathieu L, Boualam M, Saby S and Block JC. Biofilms in Drinking Water Distribution Systems. *Rev Environ Sci Biotech* 2003; 2: 147-68.
- Behets J, Declerck P, Delaedt Y, Creemers B, Ollevier F. Development and evaluation of a Taqman duplex real-time PCR quantification

method for reliable enumeration of *Legionella pneumophila* in water samples. J Microbiol Methods 2007 ; 68 :137-44.

- Benson RF, Tang PW, Fields BS., Evaluation of the Binax and Biotest urinary antigen kits for detection of Legionnaires' disease due to multiple serogroups and species of *Legionella*, J Clin Microbiol 2000; 38: 2763-5.
- Best M, Sattar SA, Springthorpe VS, Kennedy ME. Comparative mycobactericidal efficacy of chemical disinfectants in suspension and carrier tests. Appl Environ Microbiol 1988; 54: 2856-8.
- Block SS. Disinfection, sterilization, and preservation. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2001.
- Bonadonna L, Di Porto M. L'acqua come veicolo di malattie: elaborazione e valutazione di dati registrati e notificati nell'area di Roma. Roma: Superiore di Sanità 2009. (Rapporti ISTISAN 09/3).
- Boswell TC, Marshall LE, Kudesia G. False-positive *Legionella* titres in routine clinical serology testing detected by absorption with campylobacter: implications for the serological diagnosis of legionnaires' disease. Journal of Infection 1996; 32:23–26.
- Brabender W *et al.* *Legionella pneumophila* wound infection. Journal of the American Medical Association 1983; 250:3091–3092.
- Burnsed LJ, Hicks LA, Smithee LM, Fields BS, Bradley KK, Pascoe N, Richards SM, Mallonee S, Littrell L, Benson RF, Moore MR; Legionellosis Outbreak Investigation Team, A large, travel-associated outbreak of legionellosis among hotel guests: utility of the urine antigen assay in confirming Pontiac fever, Clin Infect Dis 2007; 44: 222-8.
- Cameron S, Roder D, Walker C, Feldheim J Epidemiological characteristics of *Legionella* infection in South Australia: implications for disease control, Aust N Z J Med 1991.

- Choudhary G, Hansen H Human health perspective of environmental exposure to hydrazines: A review. *Chemosphere*. 1998; 37: 801-843.
- Cloete, T. E., D. Westaard, and S. J. van Vuuren. Dynamic response of biofilm to pipe surface and fluid velocity. *Water Sci Technol* 2003; 47:57-59.
- Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, Erali M, Hillyard DR. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *J Clin Microbiol* 2000; 5: 1709-12.
- Conferenza Permanente per i rapporti tra lo stato e le regioni e le province autonome di Trento e Bolzano. Documento di Linee Guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi. *Gazzetta Ufficiale* n.103 del 5 Maggio 2000.
- Cosentini R *et al.* Community-acquired pneumonia: role of atypical organisms. *Monaldi Archives for Chest Disease* 2001; 56: 527–534.
- Deforges L, Legrand P, Tankovic J, Brun-Buisson C, Lang P, Soussy CJ, Case of false-positive results of the urinary antigen test for *Legionella pneumophila*, *Clin Infect Dis* 1999; 29: 953-4.
- Diederer, B.M.W. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *Journal of infection* 2008; 56,1-12.
- Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo del Consiglio del 23 ottobre 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque.
- Direttiva 98/83/CE del Consiglio del 3 novembre 1998 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano.
- Ditommaso S, Biasan C, Giacomuzzi M, Zotti CM, Ruggenini A, Moiragni A. Prevenzione della legionellosi: confronto tra linee guida europee ed extraeuropee. *Giornale Italiano delle Infezioni Ospedaliere* vol.10, n.1, Gennaio – Marzo 2003.

- DLgs. 9 Aprile 2008, n. 81 integrato con il DLgs n.106/2009. Testo Unico sulla salute e sicurezza sul lavoro.
- DLgs. 2 febbraio 2001, n. 31. Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. GURI n. 52 del 3 marzo 2001.
- Donlan and Costerton. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 2002; 8: 881–890.
- Dunne, W. M., Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 155–166.
- Edelstein PH. Legionnaires' disease. *Clin Infect Dis.* 1993; 16 : 741-747.
- European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet); Stockholm, January 2012 ; © European Centre for Disease Prevention and Control 2012.
- Exner M. *et al.* Prevention and control of health care-associated waterborne infections in health care facilities. *Am J Infect Control* 2005; 33: 26-40.
- Fair GM *et al.* The dynamics of water chlorination. *JN Engl. Water Works Assoc*, 1947.
- Ferronia, L Nguyena, B. Prona, G. Quesnea, M. C. Brusset and P. Berche. Outbreak of nosocomial urinary tract infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in a paediatric surgical unit associated with tap-water contamination. *Journal of Hospital Infection* 1998; 39: 301- 307.
- Flannery B, Gelling LB, Vugia DJ, Weintraub JM, Salerno JJ, Conroy MJ, Stevens VA, Rose CE, Moore MR, Fields BS, Besser RE. Reducing *Legionella* colonization in water systems with monochloramine. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 588-96.
- Formica N *et al.* The impact of diagnosis by *Legionella* urinary antigen test on the epidemiology and outcomes of Legionnaires' disease. *Epidemiology and Infection* 2001; 127:275–280.

- Freije MR. Formulating a risk reduction strategy for waterborne pathogens in hospital water system. *Am J Infect Control* 2005; 33: S50- 53.
- Gao LY, Harb OS, Abu Kwaik Y. Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. *Infect Immun* 1997; 65: 4738-46.
- Garcia MT, Jones S, Pelaz C, Millar RD, Abu Kwaik Y. *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection ; Department of Microbiology and Immunology, University of Louisville, Louisville, KY, USA 2007.
- Hackman BA *et al.* Comparison of Binax Legionella Urinary Antigen EIA kit with Binax RIA Urinary Antigen kit for detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen. *Journal of Clinical Microbiology* 1996, 34:1579–1580
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* 2004; 2: 95-108.
- Heimberger, T., Birkhead, G., and Bornstein, D. Control of nosocomial Legionnaires' disease through hot water flushing and supplemental chlorination of potable water. *J Infect Dis* 1991; 163: 413.
- Helbig JH *et al.* Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax Legionella Urinary Enzyme Immunoassay (EIA) and Biotest Legionella Urin Antigen EIA. *Journal of Medical Microbiology* 2001; 50:509–516.
- Helbig JH *et al.* Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease* 2002; 21:710–716.

- Indagine conoscitiva nazionale sulle attività di sorveglianza e controllo delle infezioni ospedaliere negli ospedali pubblici italiani; M.L. Moro, C. Gandin , A. Bella, G. Siepi, N. Petrosillo; Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto Superiore di Sanità, Roma; Centro di Riferimento AIDS e Servizio di Epidemiologia delle Malattie Infettive, Ospedale Spallanzani, Roma 2000.
- ISO 11731-2:2004 Water quality, Detection and enumeration of *Legionella* Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts.
- Kazandjian D, Chiew R, Gilbert GL. Rapid diagnosis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 infection with the Binx enzyme immunoassay urinary antigen test. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 35:954–956.
- Kilvington S, Price J. Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure *Journal of Applied Bacteriology* 1990;68:519-525.
- Kim, B. R., Anderson, J. E., Mueller, S. A., Gaines, W. A., Kendall, A. M. Literature review--efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Research* 2002; 36: 4433-4444.
- Kirmeyer GJ *et al.* Optimizing chloramine treatment. Prepared for the American Water Works Association Research Foundation, Denver, CO 1993.
- Kohler RB, Winn WC, Jr, Wheat LJ. Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires disease. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 605–607.
- Kool JL, Carpenter JC, Fields BS . Effect of monochloramine disinfection of municipal drinking water on risk of nosocomial Legionnaires' disease. *Lancet* 1999; 353:272–276.



- Le Calvez T, Trouilhé MC, Humeau P, Moletta-Denat M, Frère J, Héchard Y. Detection of free-living amoebae by using multiplex quantitative PCR. *Mol Cell Probes* 2012; 26 : 116-20.
- LeChevallier MW, Lowry CD, Lee RG. Disinfecting biofilms in a model distribution system. *J Amer Wat Works Ass* 1990; 82: 87-99.
- Mount S. Legionnaires' disease risk management 2012; 66: 23-7
- Lee S.H., Levy D.A., Craun G.F., Beach M.J., Calderon RL. Surveillance for waterborne-disease outbreak - United States, 1999-2000. *MMWR* 2002; 51: 1-47.
- Lindsay D., Von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection* 2006; 64: 313-325.
- Lowry PW *et al.* A cluster of *Legionella* sternal-wound infections due to postoperative topical exposure to contaminated tap water. *New England Journal of Medicine* 1991; 324:109–113.
- Lowry PW, Tompkins LS. Nosocomial legionellosis: a review of pulmonary and extrapulmonary syndromes. *American Journal of Infection Control* 1993; 21: 21–27.
- Luck, P. C., and J. H. Helbig. Typing of *Legionella* strains isolated from patients and environmental sources in Germany, 1990-2000, p. 267-270. In R. Marre, Y. A. Kwaik, C. Bartlett, N. P. Cianciotto, B. S. Fields, M. Frosch, J. Hacker, and P. C. Luck (ed.), *Legionella*. ASM Press, Washington, D.C 2002.
- Marshall LE, Boswell TC, Kudesia G. False positive *Legionella* serology in campylobacter infection: *Campylobacter* serotypes, duration of antibody response and elimination of cross-reactions in the indirect fluorescent antibody test. *Epidemiology and Infection* 1994; 112: 347–57.

- McDonough EA, Barrozo CP, Russell KL, Metzgar D. A multiplex PCR for detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, and *Bordetella pertussis* in clinical specimens. *Mol Cell Probes* 2005; 19: 314-22.
- Misure di prevenzione e controllo della legionellosi, Azienda Ospedaliera Universitaria San Paolo, Milano 2010.
- Muder RR. Other *Legionella* species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and practice of infectious diseases*, Churchill Livingstone, Philadelphia 2000; 2435–2441.
- Murdoch DR. Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pneumonia. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 1162-70.
- Nasser R., Rahi A., Haddad M., Daoud Z., Irani-Hakime N., Almawi W. Outbreak of *Burkholderia cepacia* bacteremia traced to contaminated hospital water used for dilution of an alcohol skin antiseptic. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2004.
- Okada C, Kura F, Wada A, Inagawa H, Lee GH, Matsushita H, Cross-reactivity and sensitivity of two *Legionella* urinary antigen kits, Biotest EIA and Binax NOW, to extracted antigens from various serogroups of *L. pneumophila* and other *Legionella* species. *Microbiol Immunol* 2002; 46: 51-4.
- Olsen CW, Elverdal P, Jørgensen CS, Uldum SA; Comparison of the sensitivity of the *Legionella* urinary antigen EIA kits from Binax and Biotest with urine from patients with infections caused by less common serogroups and subgroups of *Legionella*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 817-20.
- Ortolano, Girolamo A. PhD; McAlister, Morven B. PhD; Angelbeck, Judy A. PhD; Schaffer, Jeffrey DVM; Russell, Rosalind L. PhD; Maynard, Elise MS; Wenz, Barry MD. Hospital water point-of-use

- filtration: A complementary strategy to reduce the risk of nosocomial infection. *Am Journ Inf Control* 2005; 33: 1-19.
- Percival, S. L., J. T. Walker, and P. R. Hunter. Microbiological aspects of biofilms and drinking water. CRC Press, Boca Raton, FL. 2000.
  - Pryor M, Springthorpe S, Riffard S, Brooks T, Huo Y, Davis G, Sattar SA. Investigation of opportunistic pathogens in municipal drinking water under different supply and treatment regimes. *Water Sci Technol* 2004; 50: 83-90.
  - Rose NR *et al.* Manual of clinical laboratory immunology, 6th edition, Washington DC, ASM Press, 1282, 2002.
  - Rota MC, Caporali MG, Losardo M, Scaturro M, Ricci ML. “La Legionellosi in Italia nel 2008: rapporto annuale” *Not Ist Super S* 2009; 22: 14-19.
  - Rowbotham T J. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol* 1980; 33: 1179–1183.
  - Rutala W, Weber D. Water as reservoir of nosocomial pathogens. *Infect control Hosp Epidemiol* 1997; 18: 609-616.
  - Salvatorelli *et al.* Effectiveness of installing an antibacterial filter at water taps to prevent *Legionella* infection. *J hosp Infect* 2005; 61: 207-1.
  - Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 342-354.
  - Steinert, M., Emody, L., Amann, R., and Hacker, J. Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* 1997; 63: 2047–2053.
  - Stout JE, Yu VL. Legionellosis. *New England Journal of Medicine* 1997; 337:682–687.

- Stout, J. E., Rihs, J. D. & Yu, V. L. *Legionella*. In Manual of Clinical Microbiology, 8th edn, pp. 809–823. Edited by Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Tenover, M. C. & Tenover, R. H. Washington, DC. : American Society for Microbiology 2003.
- Svarrer CW, Lück C, Elverdal PL, Uldum SA. Immunochromatic kits Xpect Legionella and BinaxNOW Legionella for detection of *Legionella pneumophila* urinary antigen have low sensitivities for the diagnosis of Legionnaires' disease, J Med Microbiol 2012; 61: 213-7.
- Templeton KE *et al.* Development and clinical evaluation of an internally controlled, single-tube multiplex real-time PCR assay for detection of *Legionella pneumophila* and other Legionella species. Journal of Clinical Microbiology 2003; 41:4016–4021.
- U.S. Environmental Protection Agency. Drinking water contaminant candidate list 2; final notice 2005.
- Weidenkopf SJ. Water chlorination. U S Armed Forces Med J 1953; 4: 253-61.
- World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. Geneva: World Health Organization 2004.
- 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.
- Yzerman, E. P., den Boer, J. W., Lettinga, K. D., Schellekens, J., Dankert, J. & Peeters, M. Sensitivity of three urinary antigen tests associated with clinical severity in a large outbreak of Legionnaires' disease in the Netherlands. J Clin Microbiol 2002; 40, 3232–3236.

## Cap. 12 - SITOGRAFIA

- <http://ascponlinemicrobiology.blogspot.it/>
- <http://www.epicentro.iss.it/> Portale dell'epidemiologia per la sanità pubblica
- <http://www.Legionellaonline.it/> Sito del Gruppo Multicentrico per lo studio della legionellosi
- <http://www.lenntech.it/>
- [http://www.Minerva.unito.it /](http://www.Minerva.unito.it/)
- <http://www.parks.it/>
- <http://www.promega.com/biomath.it/>
- <http://www.travelclinic.it/>

## **RINGRAZIAMENTI**

Desidero ringraziare il mio relatore Prof. Angelo Baggiani del Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia per essere sempre stato disponibile a dare consigli e suggerimenti utili e il mio lavoro di tesi e per il contributo scientifico.

Un grazie particolare a Silvia per la sua disponibilità e per avermi sempre sostenuta, a Francesco e a tutti gli amici più stretti per essermi stati vicini in questo mio percorso. Vorrei esprimere la mia gratitudine anche a Gaia per essere stata una compagna di studi insostituibile.

Non so se trovo le parole giuste per ringraziare i miei genitori e mia sorella Viviana, però vorrei che questo mio traguardo raggiunto, per quanto possibile, fosse un premio anche per loro. Ad essi vanno tutta la mia stima, il mio rispetto e la mia riconoscenza. Grazie di cuore per avermi permesso di realizzare il mio progetto di vita.