



# **UNIVERSITÀ DI PISA**

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Scuola di Specializzazione in “Microbiologia e Virologia”

Direttore Prof. Mario Campa

TESI DI SPECIALIZZAZIONE

**Studio dell’acquisizione di virulenza in Legionella  
pneumophila attraverso analisi d’espressione genica e  
dell’infettività di Acanthamoeba polyphaga**

Relatore

Prof. Fabrizio Bruschi

Candidato

Dott. Ampola Massimiliano

**a.a. 2010/2011**



## INDICE

Riassunto	Pag.5
1. Introduzione	Pag.6
2. Valutazione del Rischio ed Impostazione di un Piano di Gestione del Rischio Idrico	Pag.11
3. Legionella spp.	Pag.16
3.1 Ecologia e fonti di contagio	Pag.18
3.2 Fattori di virulenza	Pag.21
3.3 Patogenesi e fattori di rischio	Pag.23
3.4 Epidemiologia e Manifestazioni cliniche	Pag.23
3.5 Diagnosi	Pag.24
4. Amebe	Pag.26
4.1 Naegleria fowleri	Pag.27
4.2 Balamuthia mandrillaris	Pag.27
4.3 Acanthamoeba spp.	Pag.28
5. Scopo della Tesi	Pag.30
6. Materiali e Metodi	Pag.32
6.1 Prelievo dei campioni	Pag.32
6.2 Analisi dei campioni ed isolamento di Legionella spp.	Pag.32
6.3 Genotipizzazione	Pag.33
6.4 Prova di cloro-sensibilità	Pag.38
6.5 Analisi dell'espressione dei geni di virulenza	Pag.40
6.6 Analisi dell'infettività macrofagica	Pag.42
6.7 Replicazione intracellulare di ceppi di L.p. Wadsworth all'interno di Acanthamoeba polyphaga non esposti al cloro in vitro.	Pag.43

6.8 Preparazione campioni per Microspia Elettronica	Pag.44
7. Risultati e Discussione	Pag.45
7.1 Esito delle indagini microbiologiche ambientali	Pag.45
7.2 Tipizzazione molecolare	Pag.51
7.3 Prove di cloro-sensibilità	Pag.56
7.4 Analisi dei profili d'espressione	Pag.58
7.5 Analisi della capacità di infezione	Pag.63
8. Conclusioni	Pag.67
Bibliografia	Pag.71

## RIASSUNTO

L'acqua erogata può essere veicolo di trasmissione di microrganismi potenzialmente patogeni e *Legionella* spp. ubiquitario negli ambienti acquatici naturali e artificiali è intrinsecamente resistente a procedure di bonifica e agente eziologico di una patologia grave ad elevata letalità.

Molteplici fattori di stress quali la carenza di nutrienti, le variazioni di temperatura, la presenza di disinfettanti, possono nell'acqua indurre *Legionella* spp. ad aumentare la permanenza all'interno delle amebe, loro ospiti naturali, consentendo al microrganismo di ottenere protezione contro l'attività battericida dei comuni disinfettanti e garantendone di conseguenza la persistenza nella rete. Le evidenze scientifiche dimostrano oramai che l'eradicazione di *Legionella* spp. è impossibile ed è quindi necessario adottare una corretta gestione del rischio per tenere sotto controllo la colonizzazione delle rete idrica.

Scopo di questa tesi stato verificare se l'espressione di alcuni geni di virulenza, implicati nell'internalizzazione in cellule ospiti, potesse essere regolata dall'esposizione al cloro e se questa induzione fosse in grado di regolare la cinetica di moltiplicazione di *Legionella* in *Acanthamoeba polyphaga*.

Ceppi rappresentativi di *Legionella pneumophila* sg 1 sono stati sottoposti a tipizzazione genetica e sequenziati, Le prove di suscettibilità all'attività battericida del cloro sono state effettuate in accordo alla norma BS EN 1040:1997. I livelli di espressione delle regioni codificanti il sistema di secrezione di tipo IVA (locus *lvh*), i prodotti del gene *mip* (macrophage infectivity potentiator) e del regione *rtxA* (repeat in toxin) sono stati studiati mediante un'analisi quantitativa relativa. Infine la variazione della virulenza è stata valutata anche attraverso co-colture di *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba polyphaga*.

# 1. INTRODUZIONE

L'acqua da sempre è una risorsa essenziale per la vita dell'uomo sia come nutrimento indispensabile per la vita sia per le svariate attività che spaziano dall'uso domestico, agricolo e industriale. E' ovvio che la mancanza di acqua impedisce

La scarsità o la mancanza di acqua impedisce o comunque limita sia lo sviluppo di un popolo ma prima ancora il soddisfacimento di bisogni primari dell'uomo. Dove le condizioni igienico-sanitarie non sono sufficienti l'acqua può essere contaminata da microrganismi patogeni quali *Vibrio cholerae*, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp..

Purtroppo anche nei paesi industrializzati è possibile contrarre infezioni di origine idrica e questo rischio a fatto sì che venissero emanate leggi che definissero i parametri di qualità dell'acqua destinata al consumo umano; in Italia è vigente il DL 2 febbraio 2001 n. 31 (DL 31/2001).

Benché i processi di disinfezione delle acque siano efficaci questa può contenere basse concentrazioni di diversi microrganismi di origine idrica potenzialmente patogeni (Exner 2005). L'acqua che attraversa l'impianto idrico mantenendo un flusso continuo non permette la proliferazione microbica ma quando la pressione dell'impianto primario diminuisce per arrivare alla rete idrica domestica nasce il problema perché spesso le complessità strutturali delle reti di distribuzione, l'epoca di costruzione degli impianti e la tipologia delle tubature non sempre sono ottimali inoltre la mancata o insufficiente manutenzione e disinfezione potrebbero infatti facilitare la colonizzazione di contaminanti microbici.

Per molti batteri la principale modalità di crescita è sulle superfici attraverso la costituzione del biofilm (Parsek 2003, Watnick 2000). I biofilms sono costituiti da comunità microbiche complesse caratterizzate da cellule aderenti ad una superficie, come possono essere le tubature idriche, ed ancorate una alle altre da una matrice gelatinosa adesiva, altamente

idratata e chimicamente complessa (EPS = extracellular polymeric substances) (Lindsay 2006) in equilibrio dinamico con la controparte dei batteri non adesi, liberi (free-floating o planktonic) (Donlan 2002).

All'interno del biofilm possono essere presenti alghe, protozoi e funghi ma i microrganismi responsabili della sua formazione sono i batteri gram-negativi. Tra quelli associati al biofilm, i più importanti nel determinismo delle infezioni ospedaliere sono soprattutto *Legionella* spp., *P. aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Mycobacteria* spp., *Acinetobacter* spp., *Aspergillus* spp. Vi sono alcune fasi progressive di costituzione di un biofilm, come illustrate in Figura 1.

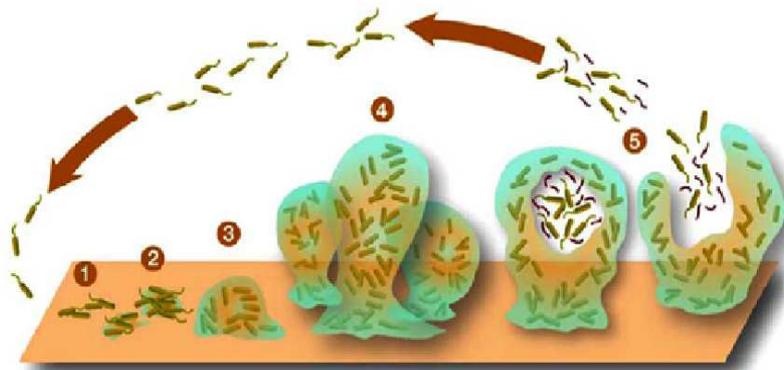


Figura 1 Rappresentazione schematica delle fasi progressive della formazione del biofilm: 1: singole cellule colonizzano la superficie, fase reversibile. 2: la produzione di EPS rende l'attacco irreversibile. 3-4: sviluppo dell'architettura del biofilm. 5: singole cellule sono rilasciate dal biofilm e il processo ricomincia

Inizialmente il legame tra microbi e superfici vi è una fase di adesione che può essere reversibile dovuta a moti browniani, a sedimentazione, a moti convettivi all'interno di un liquido, oppure a movimenti attivi di batteri mobili, ad interazioni deboli e forze elettrostatiche. Per ogni batterio ci può essere un tipo di materiale preferenziale che condiziona una miglior adesione; ad esempio *Legionella pneumophila* tende ad aderire maggiormente ai seguenti materiali, in ordine decrescente:

- lattice
- etilen-propilene
- pvc
- polipropilene
- acciaio
- acciaio inossidabile
- polietilene
- vetro.

Questo è possibile grazie alle diverse interazioni che hanno alcuni nutrienti con le superfici dove aderire incoraggiando quindi lo sviluppo del biofilm da parte di specie batteriche che necessitano proprio di quei nutrienti (Rogers 1994).

Queste peculiarità possono essere utili da considerare per esempio nella selezione dei materiali nella progettazione delle reti idriche.

Dopo la prima fase di adesione reversibile, essa diviene irreversibile grazie all'produzione di EPS da parte dei batteri svolgendo la funzione di deposito di nutrienti in grado di intrappolare altri microrganismi planctonici così come materiale inerte, tipo minerali o prodotti di corrosione (Lindsay 2006). 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 cellule tra di loro ed alla superficie (Hall-Stoodley 2004, Donlan 2002) . Si stima che le cellule microbiche rappresentino solo una piccola frazione del volume del biofilm (5-25%), essendo la restante percentuale costituita da EPS.

Quando i microrganismi sono adesi irreversibilmente questi colonizzano le superfici crescendo e moltiplicandosi, l'architettura del

biofilm è complessa ed eterogenea, infatti a tratti la matrice si fa meno densa ed a questo livello si ritrovano comunque piccole pervietà permeabili all'acqua attraverso cui arriva un continuo rifornimento di nutrienti e ossigeno oltre che agenti disinfettanti che vengono consumati dal biofilm stesso (Declerck 2009).

La formazione di questa struttura è influenzata dalle caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua, dall'entità del flusso idrico, il tipo di materiale colonizzato ed il suo stato di conservazione (Exner 2005).

L'importanza dei ristagni d'acqua nel favorire la formazione del biofilm e la crescita microbica è notevole all'interno delle condutture idriche dei grandi edifici dove i materiali possono trovarsi in condizioni non idonei, altro luogo dove è possibile riscontrare la presenza di biofilm è l'interno di serbatoi di accumulo di acqua calda, specie se a prevalente sviluppo verticale, soprattutto se la temperatura dell'acqua rientra all'interno di quella del range di crescita dei batteri termofili.

Il biofilm quindi non è una struttura fissa ma in continuo divenire, funge da deposito di microrganismi idrodifusi in grado di rilasciarli in circolo e pertanto determinare una presenza nell'acqua in uso e potenzialmente colonizzare l'uomo per via diretta o per via indiretta attraverso l'uso di strumentazioni mediche. (Exner 2005). Il rapporto di vicinanza che viene a realizzarsi tra i batteri nel contesto di questa complessa struttura permette l'instaurarsi di fenomeni di comunicazione intercellulare come il passaggio di materiale genetico per via orizzontale, con trasferimento per esempio di vettori plasmidici che codificano per geni di resistenza nei confronti di agenti antimicrobici. La presenza all'interno di questa struttura di una spessa matrice gelatinosa che avvolge intimamente i batteri svolge un'importante funzione di protezione dei batteri sia da sostanze ad azione antimicrobica utilizzate come disinfettanti della rete idrica (Lindsay 2006) (Figura 2), sia da procedure fisiche di bonifica quali lo shock termico, ovvero il periodico aumento della temperatura dell'acqua all'interno della rete idrica allo scopo di ottenerne una rapida

decontaminazione. Pertanto, nella scelta della procedura più idonea è indispensabile considerare anche la sua azione nei confronti del biofilm.

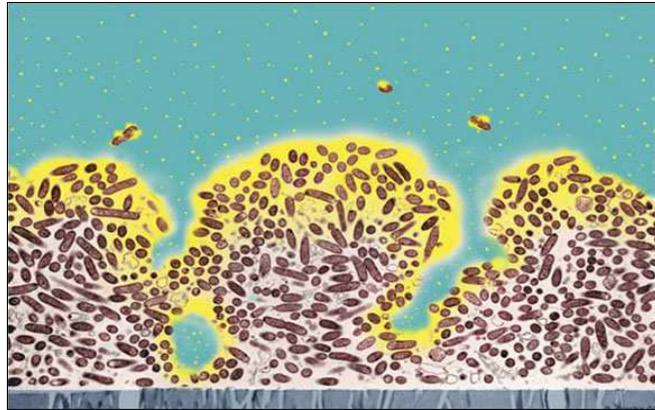


Figura 2: rappresentazione dell'architettura del biofilm: in giallo è evidenziato un agente antimicrobico che non penetra nella regione più profonda in cui i microrganismi sono protetti dall'azione del biocida

Nelle strutture sanitarie, oltre alle criticità intrinseche degli edifici, esiste un altro importante fattore di rischio, ovvero la tipologia della popolazione esposta caratterizzata da una maggior suscettibilità ad alcuni microrganismi.

Nonostante che le fonti di infezione nosocomiale siano molteplici e sostengano ogni anno, in Italia, dalle 450.000 alle 700.000 infezioni (Indagine conoscitiva nazionale 2000), probabilmente la più sottovalutata e prevenibile fonte di patogeni è l'acqua sanitaria (Anaissie 2002). Recentemente sono stati descritti numerosi casi di infezioni veicolate da *waterborne-pathogens* sostenute da *Aspergillus* spp., *Acinetobacter* spp., *Legionella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Ralstonia pickettii* e Micobatteri non tubercolari (*M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. xenopi* e *M. gordonae*); (Ferronia 1998, Anaissie 2001, Nasser 2004).

Nella moltitudine di batteri trasmessi attraverso l'acqua, risultano di particolare interesse anche virus come Norovirus e protozoi, come ad

esempio *Cryptosporidium* e *Giardia* (Freije 2005). Tra i protozoi ve ne sono inoltre alcuni (*Acanthamoeba* spp. in primo luogo) che contribuiscono al verificarsi delle infezioni nosocomiali da batteri idrodiffusi poichè instaurano con essi relazioni simbiotiche. La simbiosi è infatti un modo di proteggere i batteri intracellulari da eventuali misure di controllo della colonizzazione batterica quali l'uso di un disinfettante o lo shock termico (Barker 1992, Garcia 2007). È il caso per esempio di *Legionella* spp., identificata come paradigma della gestione generale del rischio idrico per diversi motivi: *Legionella* spp. è un microrganismo ubiquitario degli ambienti acquatici e quindi anche nelle condutture dell'acqua, nonché agente eziologico di una malattia grave ad elevata letalità; inoltre *Legionella* è, tra i patogeni veicolati dall'acqua, il più resistente a procedure di bonifica ambientale efficaci su altri microrganismi, anche per la sua capacità di persistere all'interno dei protozoi acquatici (Freije 2005)

## **2. Valutazione del Rischio ed Impostazione di un Piano di Gestione del Rischio Idrico**

Nel 2007 l'Organizzazione Mondiale della Sanità pubblica le linee guida per la prevenzione e il controllo legionellosi (WHO 2007), nel quale vengono indicati come strutture ad alto rischio tutti i presidi sanitari (ospedali, ma anche case di riposo, case di cura, centri di dialisi, studi dentistici) così come anche scuole ed alberghi. Questo è giustificato da un lato perché vi si possono trovare individui potenzialmente suscettibili, dall'altro perché tali strutture hanno spesso delle complessità infrastrutturali importanti per quanto riguarda la rete idrica, che possono determinare la creazione di nicchie biologiche nelle quali proliferano numerosi tipi di germi, limitando così l'efficacia dei provvedimenti di controllo della colonizzazione microbica. Nel testo viene indicato come l'approccio alla gestione del rischio idrico debba essere sistematico e multicomprendivo, ovvero non solo devono essere presi in considerazione ogni tappa dell'approvvigionamento idrico, dalla fonte di distribuzione fino al

consumatore, ma è necessario conoscere a fondo l'ecologia microbica esistente nella struttura presa in esame (Exner 2005); nelle linee guida si legge infatti che il modo più efficace per garantire la sicurezza dell'acqua destinata al consumo umano consiste in una valutazione globale del rischio (WHO 2004). Tale tipo di approccio è definito *Water Safety Plan*, ossia un piano di sicurezza dell'acqua. Di fatto, esso è parte integrante di un piano più ampio che prevede di fissare gli obiettivi da raggiungere in termini di salute pubblica, ovvero assenza di infezioni contratte attraverso l'esposizione a fonti idriche antropiche, l'impostazione di un *Water Safety Plan* con la programmazione delle azioni da perseguire per il raggiungimento di tali obiettivi e la realizzazione di un piano di sorveglianza per la conferma del raggiungimenti degli stessi.

E' opportuno che le autorità responsabili della sicurezza dell'approvvigionamento idrico di una determinata struttura sviluppino uno specifico piano di gestione del rischio, nella progettazione del quale occorre una valutazione sistematica e dettagliata della struttura esistente e dei pericoli possibili - biologici, chimici, fisici, o di condizioni che abbiano la potenzialità di causare danni alla salute umana - e l'impostazione di misure di controllo efficaci (WHO 2007).

La pianificazione di un efficace piano di gestione del rischio idrico prevede lo sviluppo di diverse tappe (Freije 2005):

- 1) Valutazione dell'impianto attraverso la formazione di un Gruppo di Lavoro multidisciplinare, costituito da esperti che conoscano profondamente sia il sistema di distribuzione locale, sia tutte le condizioni che favoriscano la colonizzazione e la crescita microbica al suo interno. Tale gruppo ha il compito di descrivere e fornire documentazione riguardo la struttura del sistema esistente, di fare una valutazione dei pericoli (si intende per pericolo la presenza di un agente biologico, chimico, fisico o radiologico che abbia la potenzialità di causare un danno) (WHO 2004) e dei rischi (il rischio è la probabilità che il pericolo individuato causi un

danno nelle popolazioni esposte) connessi a tale struttura, considerando la suscettibilità della popolazione esposta, individuando i punti di maggior criticità all'interno della rete esistente dove si renda necessario un intervento

2) Monitoraggio e Controllo, attraverso l'identificazione di misure di controllo che garantiscano la qualità dell'acqua erogata e siano in grado di impedire il verificarsi del pericolo considerato. Le misure di controllo per i microrganismi includono la completa esclusione del microrganismo stesso mediante eradicazione e prevenzione di ulteriori contaminazioni, la modificazione dell'ambiente, in tal caso delle condizioni vigenti all'interno della rete idrica, allo scopo di minimizzare la colonizzazione e la crescita microbica (es. temperatura, pH) e l'uso di uno specifico disinfettante efficace sulla popolazione microbica considerata, con un buon rapporto costo/beneficio e che sia applicabile nel sistema in questione, nonché la manutenzione dell'impianto. È importante monitorare in tempo reale i valori di temperatura, pH e della concentrazione del disinfettante e che sia impostata una sorveglianza ambientale. Essa deve prevedere il campionamento dell'acqua al punto d'uso secondo protocolli condivisi e la conta delle colonie microbiche, la quale deve rientrare all'interno di parametri di riferimento specificati in provvedimenti normativi o linee-guida vigenti. La metodica colturale non è da intendersi come misura di controllo, ma fornisce un'indicazione essenziale in termini di funzionalità ed efficacia del piano di sicurezza impostato permettendo di validarlo o di modificarlo a seconda dei risultati.

3) Comunicazione del rischio, ovvero la documentazione dei provvedimenti intrapresi, la messa a punto di piani di intervento (ad esempio in caso di eventi imprevedibili), la formazione del personale.

Si noti come alla messa a punto di un simile piano faccia seguito la sorveglianza; è infatti opportuno effettuare una continua vigilanza, affinché il piano stesso sia applicato correttamente, ed è importante che sia inoltre impostata una stretta sorveglianza clinica, in modo tale che i casi di infezione da patogeni idrodiffusi siano riconosciuti e trattati

tempestivamente. Un problema attualmente riconosciuto in tal senso è infatti una significativa sottostima del rischio correlato all'esposizione dell'acqua erogata mediante la rete idrica, soprattutto all'interno di strutture ospedaliere. A causa di tale sottostima anche nel nostro Paese in numerose strutture non esiste una corretta politica di gestione del rischio idrico. Proprio per il basso indice di sospetto che ne deriva, è frequente che infezioni di origine idrica non siano riconosciute come tali e siano trattate empiricamente. Ciò da un lato peggiora il decorso clinico del paziente, il quale non riceve il trattamento antibiotico più idoneo per la sua specifica patologia, e dall'altro contribuisce a sottostimare l'incidenza e la prevalenza di tali patologie, che decorrono misconosciute. I dati al riguardo infatti sono ottenuti dalle schede di notifica ospedaliere. Tale problematica è emersa in modo paradigmatico con l'impostazione di procedure di controllo per contrastare l'infezione nosocomiale da *Legionella* spp.: negli ultimi anni i casi in Italia sono andati continuamente aumentando, grazie al maggior indice di sospetto e dunque alla migliore sorveglianza clinica, oltre che alla disponibilità di test diagnostici rapidi e specifici. Si pensi a tal proposito che dal 1983 al 1992 sono stati notificati in media 36 casi annui; dal '92 al '98 si è avuto un incremento con una media di 106 casi annui, che è progredito fino ad arrivare al 2008, anno in cui le notifiche sono state 1.189 (Rota 2008). Si è potuta ottenere in questo modo una migliore gestione clinica di tale patologia ed una conoscenza della problematica più vicina alla realtà, per quanto ancora vi sia opinione che una quota importante delle infezioni da *Legionella*, soprattutto nosocomiali, decorra misconosciuta.

Dalle raccomandazioni dell'OMS sulle modalità di valutazione e gestione del rischio idrico si evincono alcuni elementi indispensabili da considerare.

a) La conoscenza del problema

Innanzitutto, una volta riconosciuti i pericoli prioritari verso i quali si voglia impostare una strategia di controllo del rischio, bisogna conoscerne profondamente ogni caratteristica affinché tale strategia possa essere

davvero efficace. Questo per quanto riguarda i patogeni veicolati tramite l'acqua significa essere a conoscenza di molteplici punti chiave, tra cui:

- l'ecologia microbica esistente nella struttura presa in esame
- le condizioni che favoriscono la colonizzazione della rete idrica e la crescita batterica, come la temperatura ottimale dell'acqua, il pH o i nutrienti di cui i batteri hanno bisogno
- le modalità di trasmissione del germe, che sono diverse a seconda del patogeno considerato
- le dosi minime infettanti di tali patogeni, superate le quali il rischio per gli esposti diviene sostanziale
- il profilo di sensibilità nei confronti dei vari disinfettanti
- le manifestazioni cliniche della patologia ed il trattamento antibiotico più appropriato

b) La conoscenza delle caratteristiche della popolazione esposta

Il rischio di contrarre un'infezione da patogeni idrodiffusi dipende da una dinamica interazione tra il germe e l'ospite (Exner 2005). Fattori rilevanti in tal senso sono l'intensità dell'esposizione (considerando sia il tempo di esposizione sia la carica microbica); le caratteristiche del germe (valutandone anche il possesso e l'espressione di specifici fattori di virulenza); lo stato immunitario dell'ospite. In modo teorico, il rischio di contrarre una simile infezione è stato così semplificato (Ortolano 2005):

$$\text{Rischio infettivo} = \frac{\text{Carica microbica} \times \text{Virulenza del patogeno}}{\text{Stato immunitario dell'ospite}}$$

Naturalmente questa formula non dà una stima precisa ma fornisce un'indicazione teorica su quali siano le relazioni che intercorrono tra il rischio e gli altri fattori, sussistendo una proporzionalità diretta tra esso e i fattori di aggressività del patogeno ed una proporzionalità inversa rispetto

alla efficienza della funzione immunitaria dell'ospite. Proprio questo punto è da tenere in seria considerazione. Infatti si può osservare che sebbene non si possano conoscere le caratteristiche di ogni singolo individuo che si esponga alla fonte di contagio, ovvero l'acqua al punto d'uso, pur tuttavia sia possibile fare delle ragionevoli previsioni. Infatti all'interno dei presidi ospedalieri esistono alcuni reparti che costantemente ospitano pazienti definiti "a rischio", ovvero pazienti con difese immunitarie fortemente compromesse a causa o di una grave patologia di base oppure della somministrazione di terapie immunosoppressive. Questo si verifica ad esempio nelle unità di terapia intensiva o nei reparti di oncologia, ematologia, chirurgia dei trapianti, neonatologia, malattie infettive. Dunque, come sottolineano sia numerosi Autori sia le raccomandazioni dell'OMS (Ortolano 2005, Stout 1997) esiste la necessità di effettuare una stratificazione del rischio imponendo degli standard di qualità che varino a seconda del reparto considerato, standard che è opportuno siano molto alti nei reparti a rischio e comunque adeguati all'utenza anche in quelli giudicati a minor rischio, per realizzare una maggiore tutela della salute dei pazienti (Ortolano 2005). Parimenti, per raggiungere questo scopo, viene sottolineata l'opportunità di avvalersi di un approccio integrato che si avvalga di tutti gli strumenti possibili, purché applicabili e sostenibili (WHO 2007).

Dal momento che *Legionella* spp. è forse il più ubiquitario tra i patogeni veicolati tramite l'acqua ed è tra i più resistenti a procedure di bonifica ambientale 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 (Freije 2005).

### **3. *Legionella* spp.**

Unico genere appartenente alla famiglia *Legionellaceae* è *Legionella*, inoltre conosciute circa 50 specie comprendenti 70 sierogruppi. *Legionella*

*pneumophila* è quella maggiormente associata alla patologia umana e si contano al suo interno almeno 16 diversi sierogruppi con un diverso profilo di patogenicità.

Si stima che in Europa circa il 70% delle infezioni sostenute da *Legionella* spp. sia in realtà da ascrivere a *L. pneumophila* sierogruppo 1, il 20-30% sia dovuto a *L. pneumophila* sg. 2-16 e il 5-10% associato a specie diverse da *L. pneumophila* (WHO 2007).

Tra queste, le più frequentemente isolate sono *L. micdadei*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii* E' possibile comunque che i casi sostenuti da queste ultime specie sia attualmente sottostimata, a causa della mancanza di test diagnostici appropriati (Fields 2002). L'accezione di "pneumophila" indica lo spiccato tropismo per il tessuto polmonare; grazie al dottor Joseph E. Mc Dade, microbiologo e ricercatore del CDC che fece ricerche sui deceduti nel famoso raduno della Legione Americana al Bellevue Stratford Hotel di Philadelphia nel luglio del 1976.

*Legionella pneumophila* è un sottile bacillo aerobio con una lunghezza compresa tra 1,5 e 5  $\mu\text{m}$  e una larghezza tra 0,3 e 0,9  $\mu\text{m}$ , gram-negativo, asporigeno, dotato di relativa mobilità grazie a uno o più flagelli (Figura 3).

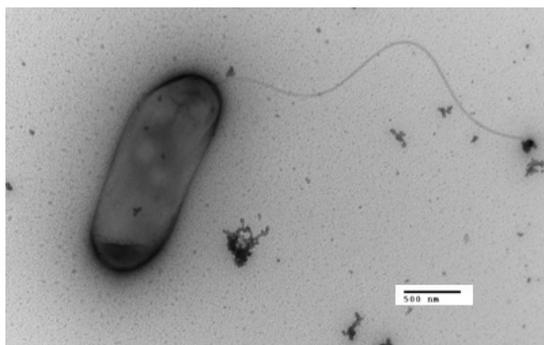


Figura 3: *Legionella pneumophila*

Legionella, patogeno intracellulare, crece con difficoltà su comuni terreni di coltura risulta, pertanto vengono utilizzati terreni specifici come l'agar "buffered charcoal yeast extract" (BCYE), terreno standard per

l'isolamento contenente ferro, cisteina e  $\alpha$ -chetoglutarato in tampone ACES (pH 6,9); dove l'estratto di lievito garantisce un'elevata concentrazione di nutrienti, mentre il carbone attivo serve ad eliminare diversi composti tossici come i radicali dell'ossigeno.

Altri terreni selettivi sono il "Wadowsky Yee Medium" (MWY) e il "glicina-vancomicina-polimixina B-cicloeximide" (GVPC) (Figura 4). Entrambi i terreni contengono glicina, polimixina B e vancomicina: la glicina indebolisce la parete batterica facilitando l'azione degli antibiotici, la polimixina B inibisce la crescita dei batteri Gram-negativi mentre la vancomicina agisce contro i Gram-positivi. Il terreno MWY contiene anche anisomicina che agisce contro i lieviti, mentre il GVPC è arricchito con cicloeximide che sopprime la crescita dei funghi.

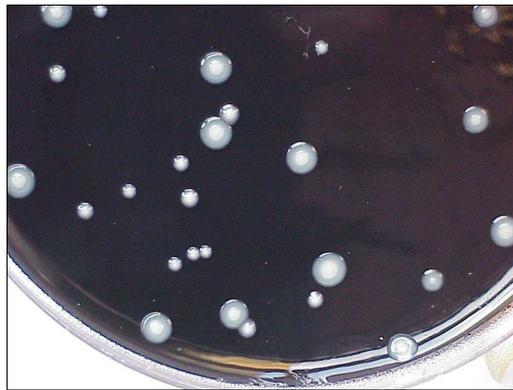


Figura 4: Colonie tipiche di *Legionella* spp. sul terreno GVPC

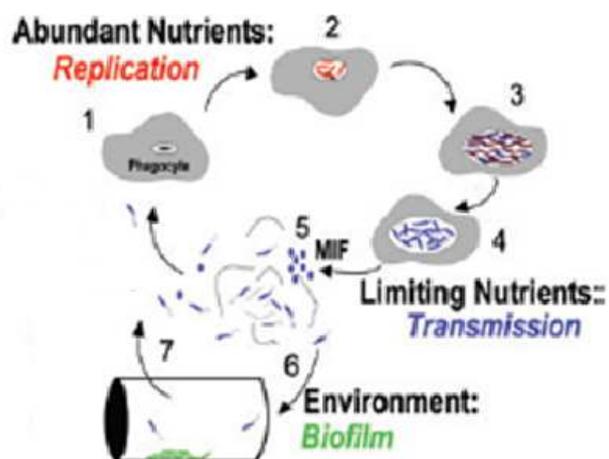
### 3.1 Ecologia e fonti di contagio

Essendo *Legionella* spp. un microrganismo praticamente ubiquitario negli ambienti acquatici naturali è possibile ritrovarlo nei fiumi, laghi e sorgenti termali, è un microrganismo acido-resistente in grado di sopravvivere in un range di pH tra 5.0 e 9.2 (Sheehan 2005). Essendo un batterio termofilo è comunque in grado di sopravvivere per brevi periodi a temperature di 5°C e di 60°C, si riproduce ad una temperatura compresa tra 25°C e 45°C, con un optimum tra 32° e 42°C.

Sotto i 20°C il tasso di crescita si arresta mentre a 50°C può sopravvivere per diverse ore, a 70°C quando distrutto in modo istantaneo (Yu 2000). Questo comportamento ci spiega perché a livello ambientale non tutti gli habitat acquatici sono colonizzati da *Legionella* spp., oltre al fatto che altri batteri eterotrofi come *Pseudomonas* spp. e *Aeromonas* spp., isolati da acqua potabile, inibiscono la crescita di *Legionella* spp. (Toze 1990).

Temperatura, pH e concorrenza vitale sono fattori critici per la proliferazione di *Legionella* negli ambienti acquatici naturali e artificiali. Tuttavia la *Legionella* negli ambienti artificiali, dove la stagnazione dell'acqua e il basso flusso idrico favoriscono la formazione del biofilm e la creazione di nicchie ecologiche, trova le condizioni ottimali per la sua replicazione. Inoltre, la *Legionella*, che in vitro è capace di formare biofilms, in natura tende a colonizzare il biofilm pre-esistente, (Watnick 2000).

Sebbene questi microrganismi non si replicano abbondantemente in ambiente extracellulare possano formare microcolonie su biofilm che protegge i microrganismi stessi dall'attività dei biocidi come il cloro (Harb 2000), permettendo quindi al batterio di ottenere dall'ambiente, o meglio dal parassitismo con alcune specie di protozoi, il necessario per la sua proliferazione e sopravvivenza (Declerck 2009)(Figura 5).



**Figura 5: ciclo biologico di *Legionella* spp.:** durante la fase di replicazione, il batterio si replica all'interno dei protozoi; viene poi liberato nella fase di trasmissione verso nuove cellule ospiti.

Quattordici specie di amebe e due specie di protozoi ciliati sono stati identificati come potenziali ospiti di *Legionella pneumophila* in natura (Fields 2002). Alcune specie di amebe a vita libera del genere *Acanthamoeba* e *Naegleria* forniscono i substrati di crescita necessari per la replicazione di *Legionella* spp. (Rowbotham 1980), questo potrebbe spiegare quindi la persistenza di *Legionella* spp. nella rete di distribuzione dell'acqua (Harb 2000).

La presenza intracellulare di *Legionella* spp. all'interno dei protozoi la protegge dalla competizione microbica, dalla predazione da parte di altri microrganismi ma soprattutto da stress ambientali e dalla disinfezione (Molmeret 2005). Quando protozoi come *Acanthamoeba polyphaga* o *Hartmannella vermiformis* passano dalla forma di trofozoita ad una di resistenza definita cisti la resistenza aumenta (Chang 2008) (Figura 6).

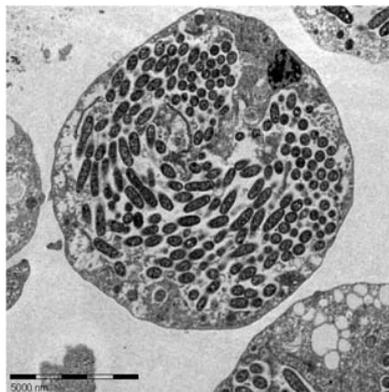


Figura 6: *Hartmannella vermiformis* parassitata da *Legionella pneumophila*

La *Legionella* può comunque sopravvivere in forma libera anche in condizioni ambientali avverse grazie alla capacità di entrare in uno stato vitale ma non coltivabile (VBNC) una capacità condivisa da moltissimi microrganismi, tra cui patogeni come *Campylobacter* spp., *E. coli*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Vibrio* spp. (Oliver 2005).

In questa forma i batteri mostrano bassi livelli di attività metabolica in risposta a stimoli ambientali stressanti, in un recente studio è stato dimostrato che la vitalità di *A. polyphaga* non infettata da Legionella si è ridotta più dell'80% a seguito di trattamenti con concentrazioni di cloro superiori a 256 ppm, mentre nei protozoi infetti era significativamente diminuita al 40%. I ceppi batterici risultavano non più coltivabili dopo esposizione a concentrazioni di cloro superiori a 512 ppm, tuttavia l'allestimento di co-colture con amebe induceva la ricomparsa di coltivabilità (Cachafeiro 2007, Garcia 2008, Rangel-Frausto 1999, Garcia Nuñez 2007),

### **3.2 Fattori di virulenza**

Il gene *mip* (macrophage infectivity potentiator) è stato il primo gene associato alla virulenza ad essere clonato (Cianciotto 1989); il locus codifica per una proteina di superficie di 24-kDa dotata di attività peptidil-prolil *cis/trans* isomerasica in grado di inibire la calcineurina, una fosfatasi presente in numerose cellule eucariotiche implicata in diversi meccanismi di segnalazione intracellulare (Wintermeyer 1995), andando quindi ad alterare le funzioni regolatorie della cellula ospite. Mutazioni del gene *mip* rendono Legionella incapace di sopravvivere all'interno del fagocita (Cianciotto 1989).

Un nuovo sistema di secrezione è stato recentemente descritto in letteratura; si tratta di una regione che presenta omologie con alcune sequenze denominate *vir* di *Agrobacterium tumefaciens* corrispondenti in Legionella al locus *lvh* (Legionella virulence homologues), mentre il locus *lvr* (Legionella vir region) è risultato esclusivo del genere *Legionella*.

La regione *lvh* è localizzata su un elemento mobile nei ceppi Paris e Philadelphia di *Legionella pneumophila* e codifica per un particolare sistema di secrezione implicato nell'aderenza e sopravvivenza intracellulare (Segal 1999) oltre che nella replicazione (Ridenour 2003); la sua forma

come la velocità di replicazione sono condizionati dalla fase di crescita di *Legionella pneumophila* (Doléans-Jordheim 2006).

La regione *rtxA* (repeats in toxin), appartenente al locus *enhI*, è un ulteriore fattore di virulenza ampiamente conservato tra i ceppi di *Legionella pneumophila* e codifica per una grande proteina multifunzionale di circa 7000 residui amminoacidici; la regione è comune anche ad altri patogeni quali *Bordetella pertussis*, *Escherichia coli* o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

Dopo l'ingresso nelle cellule ospiti, il fagosoma contenente *Legionella pneumophila* viene rivestito da una membrana originatasi dal reticolo endoplasmatico rugoso e viene inibita la fusione con il lisosoma. Dopo un periodo iniziale di adattamento all'ambiente intracellulare inizia la moltiplicazione durante la quale l'attività di formazione dei pori è inibita (Harb 2000). La patogenicità nelle amebe è dovuta principalmente alla capacità di causare lisi cellulare; l'attivazione del gene *rtxA* avviene durante la fase di trasmissione, durante la quale la sua attivazione causa la formazione di pori e quindi lisi cellulare (Cirillo 2000, 2001, 2003) (Figura 8-9).

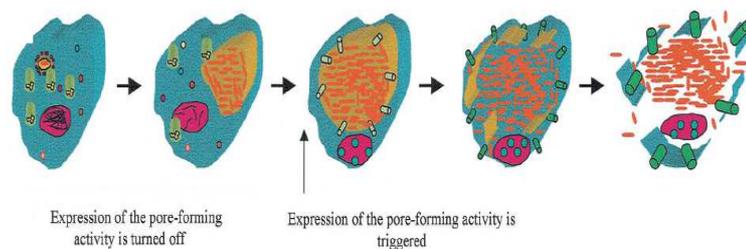


Figura 8: modello di crescita intracellulare e di evasione mediato dalla formazione dei pori di membrana

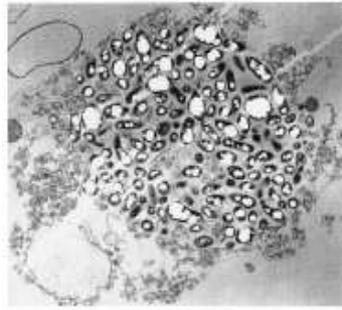


Figura 9: fotografia al microscopio elettronico durante la lisi di *Acanthamoeba polyphaga*

### **3.3 Patogenesi e fattori di rischio**

La modalità di trasmissione di Legionella all'uomo è per inalazione di aerosol contaminato, le goccioline una volta inalate sono in grado di raggiungere le diramazioni più distali dell'apparato respiratorio in modo tanto più efficace quanto più esse sono piccole, risultando più pericolose le particelle con diametro inferiore a 5 $\mu$ m.

Il rischio di contrarre questa patologia dipende dalla suscettibilità individuale del soggetto esposto oltre che dall'intensità dell'esposizione. La suscettibilità individuale è a sua volta condizionata dalla presenza di alcuni specifici fattori di rischio 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 (Documento di linee-guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi 2000).

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.

### **3.4 Epidemiologia e Manifestazioni cliniche**

Il termine legionellosi si riferisce a due sindromi cliniche causate dal batterio Legionella, la febbre di Pontiac e la malattia dei legionari. La

legionellosi è una malattia soggetta a obbligo di notifica nella Classe II (DM 15 dicembre 1990), ma dal 1983 è stato istituito anche un Registro Nazionale della legionellosi i cui dati vengono poi confrontati con quelli del Ministero della Salute per avere una ulteriore verifica della completezza delle informazioni ed una migliore sorveglianza di tale patologia.

Febbre di Pontiac: si tratta di una patologia simil-influenzale, con risoluzione spontanea nello spazio di 2-5 giorni. Dopo un'incubazione di 24-48 ore compare febbre spesso accompagnata da mialgie, astenia, cefalea, tosse secca, talora nausea e vomito. Manca un interessamento polmonare e solitamente non è necessaria alcuna terapia antibiotica.

Malattia dei legionari: si tratta di una patologia grave, l'incubazione dura 2-10 giorni. All'esordio clinico, sintomi e segni caratteristici sono rappresentati da una febbre elevata (anche  $>40^{\circ}\text{C}$ ), tosse scarsamente produttiva, dolore toracico, cefalea, mialgie, astenia. Successivamente tendono a comparire segni e sintomi extrapolmonari, soprattutto gastrointestinali come dolori addominali, nausea, vomito e diarrea, manifestazioni neurologiche, in particolare stato confusionale, disorientamento, vertigini e letargia.

### **3.5 Diagnosi**

Il metodo diagnostico di elezione è la metodica colturale con isolamento ed identificazione del microrganismo a partire dall'escreato o dal lavaggio bronco-alveolare. Questa metodica mostra una specificità pari al 100% e sensibilità pari all'80%, pur avendo alcuni inconvenienti: meno del 50% dei pazienti presenta una tosse produttiva e quindi è difficile ottenere materiale idoneo alla semina su piastra e inoltre Legionella non cresce sui comuni terreni di coltura (possono essere usati a questo scopo BYCE, o GVPC) e necessita di svariati giorni (almeno 7) per la formazione di colonie tipiche. Si stima che solo il 20% dei pazienti siano studiati in tal modo..

La tecnica diagnostica maggiormente utilizzata (Rota 2008) è la ricerca dell'antigene polisaccaridico solubile di *Legionella* nelle urine. Questa metodica presenta il vantaggio della facilità di esecuzione, considerando la facile reperibilità del campione da analizzare. Tuttavia la reperibilità dell'antigene fino a 60 giorni non discrimina la fase di infezione (fase acuta, fase di convalescenza o infezione pregressa) e inoltre di essere in grado di rilevare praticamente solo antigeni di *Legionella pneumophila* sg. 1 pur con buona sensibilità (80%) e specificità (>99%). Quindi, pur essendo *L. pneumophila* sg. 1 responsabile di un'altissima percentuale di casi, legionellosi causate da altri sierogruppi o specie restano con tale metodica misconosciute.

Tecniche immunologiche come l'immunofluorescenza indiretta sono più utile a fini epidemiologici che diagnostici. Inoltre a volte il titolo anticorpale aumenta ed è anche stata descritta una reattività crociata tra *L. pneumophila* ed alcuni batteri gram-negativi (Harrison).

La microscopia ottica è poco utile in quanto le ridotte dimensioni del batterio pongono un limite, tuttavia è possibile considerare un'infezione di legionellosi se si osservano batteri Gram-negativi nelle secrezioni delle basse vie respiratorie di un paziente immuno-compromesso, con una coltura negativa dopo 24 ore sui terreni di uso corrente (linee-guida). Secondo le linee guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi si distingue un caso accertato se è stato effettuato l'isolamento diretto di *Legionella* spp. da materiale organico, se si è avuta sieroconversione e positività all'antigenuria.

Nell'impostazione terapeutica macrolidi come claritromicina e azitromicina mostrano un profilo di azione più efficace sui batteri intracellulari come *Legionella* essendo caratterizzati da una migliore penetrazione all'interno dei tessuti (WHO 2007), mentre le  $\beta$ -lattamine, spesso usate in prima istanza per trattare empiricamente polmoniti nosocomiali di presunta eziologia streptococcica, non risultano particolarmente efficaci.

## 4. AMEBE

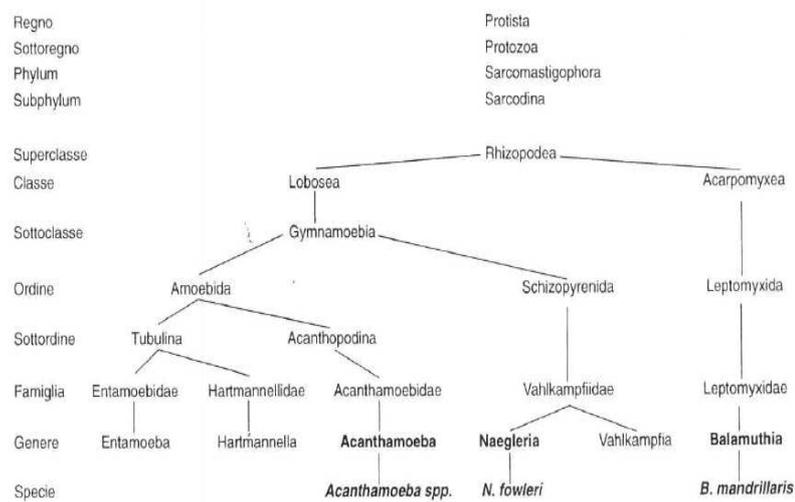


Foto da: Martinez, A.J. & Vinesvara

Le amebe a vita libera quali *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* possono occasionalmente causare quadri patologici per l'uomo. Il decorso della malattia è acuto e spesso fulminante caratterizzato da meningoencefaliti, e cheratiti acute.

La definizione di amebe a vita libera deriva dal fatto che l'habitat naturale di queste amebe, patogene e non patogene per l'uomo, sono le acque di superficie sia naturali come laghi, fiumi e torrenti, sia artificiali quali piscine e vasche di raffreddamento in impianti industriali, senza dimenticare le falde sotterranee, il fango ed il pulviscolo atmosferico nel quale la sopravvivenza è assicurata dalle forme cistiche E' un po' troppo ermetico.

#### 4.1 *Naegleria fowleri*

*N. fowleri* è flagellata, oltre allo stadio classico di trofozoite è riconosciuta anche una forma vegetativa piriforme che presenta due - quattro flagelli, questo stato è temporaneo e reversibile alla forma ameboide classica. La forma ameboide ha un diametro massimo di 32  $\mu\text{m}$  e il movimento è dato dall'emissione di pseudopodi. Il nucleo in tutte le specie ha un aspetto vescicoloso con grosso nucleolo centrale. *N.fowleri* è termofila, in vitro è in grado di sopravvivere a temperature di 42-45°C, resistente nella fase cistica ma sensibile all'essiccamento.



Foto da: <http://www.dpd.cdc.gov>

#### 4.2 *Balamuthia mandrillaris*

Anche *B. mandrillaris* è patogena per l'uomo, al microscopio ottico i trofozoiti presentano dimensioni tra 15 e 60  $\mu\text{m}$  e lunga circa 40  $\mu\text{m}$ . L'aspetto è ramificato con gli pseudopodi estroflessi in tutte le direzioni. Le cisti sono tendenzialmente sferiche con un diametro di circa 15  $\mu\text{m}$ . La struttura delle cisti porta a pensare che possano sopravvivere in condizioni sfavorevoli.

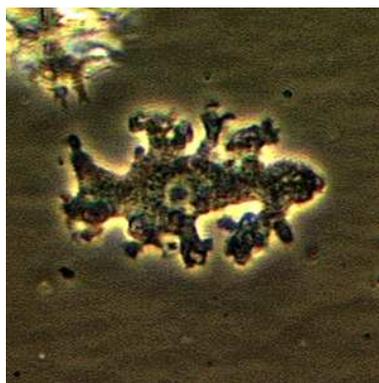


Foto da: <http://www.dpd.cdc.gov>

#### **4.3 *Acanthamoeba* spp.**

Diverse specie di *Acanthamoeba* sono risultate patogene per l'uomo come agenti eziologici di encefaliti o cheratiti. Dal punto di vista morfologico le forme vegetative hanno un diametro massimo di 55  $\mu\text{m}$  a seconda della specie, si distinguono da *Balamuthia mandrillaris* e *Naegleria fowleri* per la costante presenza di estroflessioni citoplasmatiche filiformi. Questa mancanza di veri e propri pseudopodi fa sì che abbiano movimenti più lenti rispetto alle altre specie. Gli organuli cellulari risultano concentrati nell'endoplasma, il nucleo presenta un grosso cariosoma centrale. La forma cistica appare globosa con un diametro di 18-23  $\mu\text{m}$ , la superficie esterna è mammellonata interrotta da pori dai quali escono i trofozoiti quando le condizioni ambientali ne permettono la sopravvivenza e la moltiplicazione.

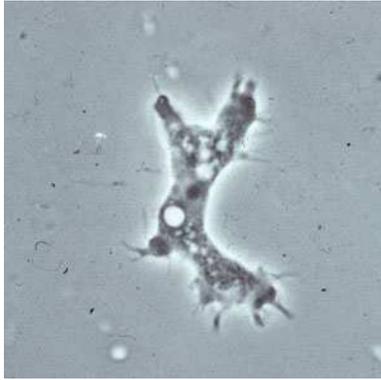


Foto da: <http://www.dpd.cdc.gov>

## 5. SCOPO DELLA TESI

Lo studio è stato condotto allo scopo di analizzare l'applicabilità di tecniche di biologia molecolare alla valutazione dell'efficacia di un piano di gestione del rischio idrico rivolto al controllo della colonizzazione di *Legionella* spp. all'interno di reti idriche di un ospedale, dove a partire da Marzo 2002, è attivo un "water safety plan" a causa del verificarsi di casi di legionellosi nosocomiale, piano che ha previsto come azioni di controllo l'installazione di generatori di biossido di cloro e la filtrazione ai punti d'uso terminali.

L'applicazione delle tecniche di biologia molecolare ha come fine quello di identificare e tipizzare i ceppi ambientali di *Legionella* spp. per descriverne la distribuzione spaziale e temporale, valutare gli effetti a lungo termine della clorazione in continuo sull'ecologia microbica della rete idrica ospedaliera e, infine, stabilire se gli interventi siano stati in grado di influenzare la virulenza di questo patogeno verso l'ospite ambientale e di conseguenza nei confronti dell'ospite occasionale, l'uomo. A tal scopo, gli isolati sono stati tipizzati attraverso l'uso di due tecniche, una che utilizza l'elettroforesi in campo pulsato di frammenti di macro-restrizione (Pulse Field Gel Electrophoresis) l'altra il sequenziamento allelico (Sequence Base Typing) di sette loci di riferimento (*mip*, *flaA*, *pile*, *asd*, *mompS*, *proA*, *neuA*), in modo da poter confrontare la loro capacità discriminante. Successivamente, per alcuni isolati ambientali di *Legionella* rappresentativi della tipologia microbica presente nella rete idrica della struttura esaminata, è stato analizzato il profilo di resistenza al disinfettante attraverso prove di sensibilità al cloro *in vitro*, e sulle stesse prove verrà valutata la capacità del cloro di indurre l'espressione di geni di virulenza implicati nella fase di replicazione e trasmissione nelle cellule ospiti. A conferma di questa ipotesi è stata analizzata la cinetica di crescita intracellulare nell'ospite *Acanthamoeba polyphaga*, attraverso tecniche colturali e microscopia elettronica, per stabilire se l'aumento di virulenza possa essere correlato

ad una maggiore capacità di invadere le cellule ospiti al fine di spiegare la persistente colonizzazione della rete idrica ospedaliera, nonostante le misure di controllo adottate.

## 6. MATERIALI E METODI

### 6.1 Prelievo dei campioni

In questo lavoro di tesi sono stati presi in esame i risultati delle analisi condotte su 852 prelievi effettuati tra marzo 2002 e marzo 2010 in padiglioni ospedalieri dove sono state applicate da più tempo misure di controllo della contaminazione microbica della rete idrica. Le misure di controllo applicate hanno previsto l'installazione di generatori di biossido di cloro a partire dal 2003 e successivamente, sulla base della mancata eradicazione della flora microbica idrodiffusa, l'installazione di sistemi filtranti al punto d'uso nelle aree ospitanti pazienti giudicati a maggior rischio.

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. 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 e del cloro libero residuo mediante metodo colorimetrico con kit Visocolor HE (Macherey-Nagel, Düren, Germany).

### 6.2 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*). Tutti i ceppi isolati sono stati di volta in volta conservati a – 80°C e da qui sono stati prelevati al momento dell'analisi molecolare.

### **6.3 Genotipizzazione**

Sono stati selezionati per la tipizzazione molecolare 101 isolati ambientali di *Legionella pneumophila* sierogruppo 1, scegliendoli affinché fossero rappresentativi della colonizzazione microbica della struttura in esame. La scelta dei campioni da tipizzare è stata fatta sulla base di un duplice criterio che permettesse di evidenziare modificazioni della flora microbica in relazione alla messa in opera di elementi di controllo. Il criterio è stato temporale, selezionando ceppi isolati da campioni prelevati sia precedentemente sia successivamente all'installazione dei generatori di ClO<sub>2</sub> per la clorazione in continuo della rete idrica del presidio studiato (installazione risalente ad aprile

2003), e spaziale, scegliendo campioni provenienti da 17 diverse unità operative ubicate in quattro padiglioni distinti. E' stato analizzato inoltre come ceppo di riferimento *Legionella pneumophila* Philadelphia (ATCC 33152).

Con l'utilizzo della metodica SBT (Sequence Based Typing) sono stati amplificati e sequenziati 7 geni (*mip*, *flaA*, *pilE*, *asd*, *mompS*, *proA*, *neuA*) per ogni isolato; con la PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) si è potuto ottenere il profilo di migrazione elettroforetica del genoma sottoposto a digestione enzimatica dei ceppi studiati. I risultati delle due metodiche sono poi stati usati per fare una valutazione comparativa tra i vari ceppi.

**SBT:** La metodica del Sequence-Based Typing costituisce una variante del Multilocus Sequence Typing (MLST) che è stata messa a punto nello specifico per *Legionella pneumophila* dal gruppo di studio di Gaia (Gaia 2005). Questa tecnica è di rapida esecuzione ed in grado di fornire risultati altamente riproducibili; per questo motivo il gruppo europeo di studio della legionellosi (EWGLI, rinominato recentemente in European Legionnaires' Disease Surveillance Network ELDSNet) ha messo a punto un protocollo di SBT che è stato seguito in questo studio. SBT è una tecnica di sequenziamento con la quale si può ottenere l'esatta sequenza dei geni di interesse e quindi il profilo allelico (sequence-based type) del ceppo studiato. I geni che sono stati sequenziati sono *mip* (Macrophage Infectivity Protein, gene che permette la classificazione a livello di specie di *L. pneumophila*) ed altri 6 geni, ovvero *flaA* (che codifica per la subunità proteica flagellare di *L. pneumophila* sg 1), *pilE* (che codifica per una pilina tipo IV), *asd* (che codifica per l'aspartato- $\beta$ -semialdeide deidrogenasi di *L. pneumophila*), *mompS* (codificante una proteina maggiore di membrana dal peso molecolare di circa 29kDa) *proA* (codificante una zinco-metalloproteasi) e *neuA* (codificante una N-acetylneuraminate cytidyl transferase). Tutti questi sono geni si ritiene siano sottoposti ad una elevata pressione selettiva.

La prima fase di questa metodica consiste nell'estrazione del genoma a partire da sospensioni cellulari dei ceppi batterici di interesse. Si effettua poi sui geni selezionati una prima PCR (Polimerase Chain Reaction), utilizzando primer specifici. Si procede dunque alla purificazione del prodotto di PCR e si effettua una seconda amplificazione genica per il sequenziamento; si effettua poi una seconda purificazione e si inserisce il prodotto di reazione in un sequenziatore che, sfruttando la tecnica di Sanger, è in grado di riconoscere la sequenza di entrambi i filamenti di DNA dei geni di interesse. Una volta appaiate le sequenze dei due filamenti, si procede all'analisi di una porzione della sequenza nucleotidica per avere l'attribuzione allelica.

In questo studio è stato applicato il protocollo messo a punto da EWGLI (Version 1.0) ([www.ewgli.org](http://www.ewgli.org)). Il DNA genomico è stato estratto utilizzando il QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen): a 200 µl di campione (ottenuto stemperando un'ansata di patina batterica in 180µl di buffer ATL) sono stati aggiunti 20 µl di proteinasi K e 200 µl del tampone AL che assicura una lisi efficiente; il tutto è stato agitato su vortex per 15 secondi e la miscela è stata incubata a 56°C per 10 minuti. Sono stati poi aggiunti 200 µl di etanolo e, dopo agitazione su vortex per 15 secondi, l'intero volume è stato trasferito in una microcolonna e centrifugato a 6000xg per un minuto. Scartato il filtrato, sono stati eseguiti 2 lavaggi: il primo con 500 µl di Buffer AW1 (centrifugando a 6000xg per 1 minuto) ed il secondo con 500 µl di Buffer AW2 (centrifugando però a 20.000xg per 4 minuti). Trasferita la microcolonna in una eppendorf, il DNA batterico è stato recuperato con 200 µl di Buffer d'eluizione AE.

Per l'amplificazione è stato utilizzato il GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) con il protocollo di reazione proposto da Gaia (Gaia 2005), eccetto per la ProofStart™ DNA polymerase (QIAGEN) che garantisce un minor livello di errore nella sintesi della catena nucleotidica. La miscela di reazione allestita è stata: 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, MgSO<sub>4</sub> 2.5 mM, dNTPs 300 µM, Primers 1 µM, ProofStart™ DNA polymerase, DNA (0.1-1 µg). Per la purificazione

del primo amplicone è stato utilizzato il Microcon YM-100 (Millipore), che è un kit di purificazione in grado di trattenere molecole di peso molecolare superiore ai 100.000 Da. Il sequenziamento è stato eseguito utilizzando ABI PRISM BigDye terminator DNA sequencing kit (Applied Biosystems) utilizzando la seguente miscela di reazione: 1µl di soluzione di DNA (pari a 20-40 ng di DNA), 3,2 µl di primer 1µM, 3 µl Master Mix (BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, A.B.), 12,8 µl di H<sub>2</sub>O. La reazione di amplificazione ha previsto 30 cicli con le seguenti condizioni: 96°C per 10'', 50°C per 5'' e 60°C per 4'. Dunque è stata eseguita una seconda purificazione utilizzando il Centri-Sep Columns (Princeton), kit di purificazione (Sambrook 1989) che è in grado di effettuare con l'uso di un gel di Sephadex G50 una separazione tra il DNA e i prodotti di scarto a basso peso molecolare (dideossinucleotidi, sali di buffer) attraverso la centrifugazione. Infine è stata condotta l'analisi sul sequenziatore 310 ABI DNA sequencer (Applied Biosystems, US). Le sequenze analizzate all'interno dei geni di interesse sono state quelle indicate in Figura 10.

#### Amplification primers:

The positions of the primers with respect to the GenBank accession number of the reference sequence are shown below:

Gene	Primer name	Position	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature
<i>flaA</i>	<i>flaA-587F</i> (M13F)	588-587	TGTAAAACGACGGCCAGT <u>GCGTATTGCTCAAATACTG</u>	55 °C
	<i>flaA-980R</i> (M13R)	981-980	CAGGAAACAGCTATGACC <u>CCATTAATCGTTAAGTTGTAGG</u>	
<i>pilE</i>	<i>pilE-35E</i> (M13F)	12-35	TGTAAAACGACGGCCAGT <u>CACAATCGGATGGAACACAAACTA</u>	55 °C
	<i>pilE-453R</i> (M13R)	471-453	CAGGAAACAGCTATGACC <u>GCTGGCGCACTCGGTATCT</u>	
<i>asd</i>	<i>asd-511F</i> (M13F)	487-511	TGTAAAACGACGGCCAGT <u>CCCTAATTGCTCTACCATTGATG</u>	55 °C
	<i>asd-1039R</i> (M13R)	1082-1039	CAGGAAACAGCTATGACC <u>CGAATGTTATCTGCGACTATCCAC</u>	
<i>mip</i>	<i>mip-74F</i> (M13F)	58-74	TGTAAAACGACGGCCAGT <u>GCTGCAACCGATGCCAC</u>	55 °C
	<i>mip-595R</i> (M13R)	616-595	CAGGAAACAGCTATGACC <u>CATATGCAAGACCTGAGGGAAC</u>	
<i>mompS</i>	<i>mompS-450F</i> (M13F)	430-450	TGTAAAACGACGGCCAGT <u>TGACCATGAGTGGGATTGG</u>	55 °C
	<i>mompS-1128R</i>	1140-1128	<u>TGGATAAATTATCCAGCCGGACTTC</u>	
<i>proA</i>	<i>proA-1107F</i> (M13F)	1090-1107	TGTAAAACGACGGCCAGT <u>GATCGCCAATGCAATTAG</u>	55 °C
	<i>proA-1553R</i> (M13R)	1570-1553	CAGGAAACAGCTATGACC <u>ACCATAACATCAAAGCC</u>	
<i>neuA</i>	<i>neuA-196F</i> (M13F)	176-196	TGTAAAACGACGGCCAGT <u>CCGTTCAATATGGGGCTTCAG</u>	55 °C
	<i>neuA-634R</i> (M13R)	634-611	CAGGAAACAGCTATGACC <u>CGATGTCGATGGATTCAATAC</u>	

Figura 10: Sequenze geniche in esame: in sottolineato sono indicate le sequenze dei primer, mentre le rimanenti sono le sequenze dei primer M13 utilizzate per il sequenziamento

Una volta conosciute queste sequenze è stato possibile confrontarle col database online dello EWGLI, che è in grado di fornire un numero che corrisponde a quel preciso allele per ogni gene studiato. Alla fine, per ogni ceppo è stata ottenuta una sequenza di sette numeri che corrisponde al suo profilo allelico. L'ordine dei geni in ciascuna sequenza è: *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* e *neuA*.

**PFGE:** L'elettroforesi in campo pulsato (Pulsed Field Gel Electrophoresis) è una variante dell'elettroforesi su gel di agarosio che permette di separare molecole di DNA di grandi dimensioni (fino a 10 Mb).

Nella tecnica in campo pulsato viene sfruttato il comportamento peculiare che molecole di DNA di grandi dimensioni assumono in un campo elettrico che venga acceso e spento (pulsato) a brevi intervalli. Frammenti di acido nucleico di grandi dimensioni sono ottenuti incubando il genoma con endonucleasi di restrizione che, tagliando a bassa frequenza, generano un limitato numero di frammenti di alto peso molecolare. Quando grandi molecole di DNA sono sottoposte ad un campo elettrico, esse migrano nella direzione del campo ma vengono anche "stirate" nel senso della loro lunghezza. Se la corrente viene interrotta, esse iniziano a "rilassarsi" assumendo strutture elicoidali superavvolte. Il tempo necessario al rilassamento è direttamente proporzionale alla lunghezza della molecola. Il campo elettrico viene poi di nuovo applicato, nel nostro caso con una direzione che differisce dalla precedente di un angolo di 120°. Durante il periodo di assenza di campo elettrico, le molecole più lunghe hanno avuto un rilassamento minore rispetto a quelle più corte, e poiché il rilassamento deve essere completato prima di poter migrare nuovamente con l'applicazione del nuovo campo elettrico, le molecole più lunghe cominceranno a migrare in ritardo rispetto a quelle corte, separandosene quindi a poco a poco.

Alla fine della migrazione il gel viene colorato con bromuro di etidio. Questa molecola planare si lega al DNA intercalandosi tra le coppie di basi azotate. Il legame al DNA aumenta la fluorescenza intrinseca dell'etidio e quindi, quando il gel viene illuminato con luce ultravioletta, la regione contenente il DNA emetterà una fluorescenza più intensa rispetto a quella delle regioni di gel prive di DNA. Per questa metodica è stato utilizzato il Contour-clamped Homogeneous Electric Field system (CHEF MAPPER; Bio-rad, US) ed è stato seguito il protocollo di De Zoysa (De Zoysa 1999). In sintesi, sono state allestite sospensioni cellulari del ceppo da caratterizzare, e sono stati preparati blocchetti di agarosio contenenti tali cellule. Successivamente questi blocchetti sono stati sottoposti a lisi in NDS buffer (0,5M EDTA; pH 9,5; 1% Sarcosyl; 2mg/ml proteinasi K) ed in seguito sono stati posti in incubazione in presenza dell'enzima di restrizione Sfi I (Roche) per poi essere inseriti nei pozzetti all'interno del gel di agarosio usato per la migrazione elettroforetica. Le condizioni di corsa sono state le seguenti: voltaggio 6V/cm, angolo di 120°, impulso iniziale 60sec, impulso finale 5sec, tempo di corsa 40h, temperatura 14°C. Una volta terminata la corsa si sono ottenute per ogni isolato una serie di bande corrispondenti ciascuna ad un frammento di DNA; in accordo ai criteri proposti da Tenover (Tenover 1995), pattern diversi sono stati assegnati quando il profilo elettroforetico differiva per almeno tre bande. Per l'analisi filogenetica dei risultati è stato utilizzato il programma Diversity Database Software V 0.2 (Bio-Rad, US), con il quale è stato possibile avere una stima in percentuale della similarità genetica tra i diversi isolati grazie ad una analisi comparativa dei profili elettroforetici.

#### **6.4 Prova di cloro-sensibilità**

Sulla base della persistente positività dei campioni per la ricerca di Legionella dopo 7 anni di iperclorazione e dell'individuazione di un nuovo ceppo batterico solo in prelievi effettuati a seguito della

applicazione di tale metodica si è supposto che la pressione selettiva esercitata dalla clorazione in continuo potesse aver determinato la comparsa di un certo grado di resistenza nei confronti del cloro stesso. E' stato quindi deciso di saggiare la cloro-sensibilità su isolati batterici tipizzati, scegliendoli in modo che fossero rappresentativi della tipologia microbica presente nella rete idrica della struttura in esame nel corso degli anni. Il test di cloro-sensibilità è stato condotto su ceppi batterici isolati sia antecedentemente sia successivamente alla installazione dei generatori di biossido di cloro per la clorazione in continuo. Sono stati scelti ceppi appartenenti ai 2 "cloni" identificati con la SBT e la PFGE che risultavano presenti sia prima sia dopo la clorazione in continuo. I ceppi testati sono stati denominati come l'anno in cui sono stati isolati; CL2/02, CL2/08, CL01/02, CL1/07. Il test è stato inoltre condotto su un ceppo standard usato come riferimento [*Legionella pneumophila* Philadelphia (ATCC 33152)].

A tal fine sono state preparate sospensioni cellulari con una densità ottica corrispondente a 4,5 della scala McFarland, che approssimativamente garantisce una concentrazione microbica di  $10^8$  UFC/l. Parallelamente sono state preparate le soluzioni contenenti cloro a diverse titolazioni, a partire da ipoclorito di sodio (Carlo Erba Reagents, Italy), facendo diluizioni seriali in acqua sterile dechlorata e deionizzata a pH 7, 22°C, fino ad ottenere le concentrazioni di cloro libero desiderata per l'esperimento (2,5ppm). La lettura della concentrazione di cloro è stata ottenuta con metodo colorimetrico attraverso lo spettrofotometro Palintest Interface Photometer 7000 System. In accordo alle norme BS EN 1040:1997 sono stati incubati in provette sterili 0,5 ml della sospensione cellulare e 4,5 ml della soluzione di ipoclorito. Sono state usate provette diverse per ogni titolazione di cloro e per ogni tempo di contatto desiderato. I tempi di contatto studiati sono stati 5', 15', 30', 60', 120'. Allo scadere di ciascuna frazione sono stati aggiunti 100 µl 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. Subito dopo sono state condotte diluizioni seriali della sospensione ottenuta in ciascuna provetta per ogni tempo di contatto, e sono state seminate su terreno selettivo GVPC (Oxoid Ltd, UK) e incubate a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  in ambiente umido con una tensione di  $\text{CO}_2$  di 2,5% almeno per 10 giorni. Da ultimo, sono state seminate su GVPC anche diluizioni seriali della sospensione batterica di partenza per conoscere la concentrazione iniziale e poter quindi quantificare i risultati dell'esperimento.

### **6.5 Analisi dell'espressione dei geni di virulenza**

Al fine di verificare se il trattamento con il cloro sia in grado di attivare l'espressione dei geni di virulenza a differenti tempi di esposizione, è stata condotta un'analisi quantitativa relativa del mRNA delle regioni codificanti il sistema di secrezione di tipo IVA (locus *lvh*), i prodotti del gene *mip* (macrophage infectivity potentiator) e della regione *rtxA*.

L'RNA totale è stato estratto e purificato a partire da aliquote dei campioni provenienti da ciascuna prova di cloro-suscettibilità con il kit PerfectPure™ RNA Purification (5Prime) e successivamente retrotrascritto mediante il kit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis (Roche) utilizzando il GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Per l'analisi di espressione, i primers *lvh1/prpA*, *lvh2/prpA*, *lvh3/lvhB3*, *lvh4/lvhB4*, *lvh5/lvhB8*, *lvh6/lvhB9* sono stati usati per amplificare il locus *lvh* e i primers *rtx1/rtxA*, *rtx2/rtxA*, *rtx3/rtxA*, *rtx4/rtxA* per la regione *rtxA* (la sequenza dei primers è quella riportata da Samrakandi 2002) mentre per il gene *mip* i primers utilizzati erano *mip-58F* *mip-595R* (Gaia 2005).

L'analisi quantitativa relativa è stata condotta secondo il metodo del  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (Livak 2001), utilizzando la piattaforma ABI PRISM 7300 (Applied

Biosystems) e il QuantiFast SYBR Green Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in accordo al protocollo fornito dalla ditta.

Il gene 16S rRNA è stato utilizzato come reference gene per normalizzare il livello di espressione, amplificandolo con i primers 16SF e 16SR (Hindré 2008).

Il metodo del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  permette di analizzare le variazioni relative dei livelli di espressione genica, attraverso un'analisi di real-time PCR dove il valore Ct (Crossing threshold), corrispondente al ciclo di amplificazione durante il quale la curva di amplificazione interseca la detection threshold, viene utilizzato nel confronto relativo dei livelli di amplificazione. In breve, i valori  $\Delta\Delta Ct$  sono stati calcolati come  $(Ct_{target} - Ct_{16S})_{tempo\ x} - (Ct_{target} - Ct_{16S})_{non\ trattato}$ , dove il target è il gene di virulenza di *L. pneumophila* isolato prima o dopo l'applicazione della clorazione in continuo dell'acqua nella rete idrica ospedaliera, mentre i valori x corrispondono ai tempi di contatto rispettivamente di 5, 15, 30, 60 e 120 minuti di esposizione del campione al cloro in vitro. I valori  $\Delta\Delta Ct$  sono stati calcolati confrontando i valori dei campioni trattati rispetto a quelli dei non trattati. L'espressione genica è stata determinata anche su *L. pneumophila* Philadelphia ATCC 33152, ceppo mai esposto al cloro, considerandolo come controllo.

La validazione del metodo del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  e l'efficienza di amplificazione sono stati determinati (Livak 2001). Analizzando i valori di slope, ottenuti riportando le diluizioni in base logaritmica del cDNA rispetto ai valori di  $\Delta Ct$ , queste sono risultate sempre vicine allo zero in differenti condizioni di reazione (diversi ceppi, geni di virulenza, tempi di contatto con il cloro), dimostrando così un'efficienza simile nell'amplificazione dei geni target rispetto ai geni di riferimento.

## 6.6 Analisi dell'infettività macrofagica

Le cinetiche di crescita intracellulare in *Acanthamoeba polyphaga* di alcuni ceppi ambientali di *Legionella pneumophila*, sia esposti che non all'azione del cloro in vitro, sono state valutate con metodo colturale e con real-time PCR.

Colture di *Acanthamoeba polyphaga* cresciute in fiasche ventilate in presenza del terreno PYG (15 gr Proteose Peptone, 5 gr estratto di lievito, 10 gr D-glucosio, 3 mgr FeSO<sub>4</sub> in un litro di acqua distillata, pH 6,6; autoclave 121°C per 20 minuti) per 72 ore a 25°C, sono state infettate con sospensioni a titolo noto dei vari ceppi di *L. pneumophila*, in modo da raggiungere una M.O.I. (indice di infettività macrofagica) di 100. La quantità di ameba è stata determinata tramite conteggio in camera di Burkner, mentre per legionella sono state allestite semine in GVPC agar dopo diluizione delle sospensioni di densità corrispondente a 5 Mcfarland. Inoltre alcuni ceppi pre-clorazione e post-clorazione sono stati trattati con 2,5 ppm di cloro attivo, rispettivamente per 60 minuti e 30 minuti.

Dopo 2 ore di incubazione a 37°C, le colture sono state lavate con il buffer PAS (soluzione A: 1,2 gr NaCl, 0,04 gr MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1,42 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,36 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 100 ml di acqua distillata; soluzione B: 0,04 gr CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O in 100 ml di acqua distillata; soluzione PAS: 10 ml soluzione A + 10 ml soluzione B + 980 ml di acqua distillata, pH 6,9; autoclave 121°C per 20 minuti) e successivamente addizionate di gentamicina (100 µg/ml) per due ore, al fine di eliminazione i batteri extracellulari. Dopo ulteriore lavaggio con PAS, le colture corrispondenti al tempo “zero” sono state sottoposte a scrubbing e la sospensione risultante è stata aspirata attraverso un ago da 27G, per favorire la rottura delle amebe e la liberazione di Legionella. Le altre colture invece sono state sottoposte ad incubazione per tempi di contatto successivi, pari a 2-24-48-72-96 ore, alla fine dei quali è stata adottata la stessa procedura di lisi delle amebe sopra descritta. Per ciascun tempo di

contatto, sono stati seminati 100 µl della sospensione su GVPC per la conta della carica microbica.

Per ciascun tempo di incubazione, incluso il tempo zero, è stato conservato 1 ml di volume di sospensione finale che è stato sottoposto a qPCR. Il DNA genomico è stato estratto utilizzando il QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen) come precedentemente descritto ed è stato amplificato il gene *mip*. L'analisi quantitativa è stata condotta utilizzando la piattaforma ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems) e il QuantiFast SYBR Green Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in accordo al protocollo fornito dalla ditta.

### **6.7 Replicazione intracellulare di ceppi di *L.p.* Wadsworth all'interno di *Acanthamoeba polyphaga* non esposti al cloro in vitro.**

- Colture axeniche di *A. polyphaga* (ATCC 50998) in fase stazionaria sono state coltivate come cellule aderenti in terreno PYG per 72 ore a 25 ° C.
- L'infezione con *L.p.* Wadsworth è stata eseguita utilizzando una molteplicità di infezione (MOI) di 100 e incubando la sospensione a 37°C per 2 ore. Terminata l'incubazione i batteri extracellulari sono stati eliminati con un trattamento con gentamicina (100 µgr/ml) a 37 ° C per 2 ore.
- In diversi momenti (2, 24, 48, 72 ore) è stato determinato il numero dei batteri liberati dalle amebe, dopo la lisi di quest'ultime ottenuta attraverso il passaggio della sospensione in siringa 27G, e seminando su piastre di agar GVPC.
- L'avvenuta internalizzazione di Legionella nelle amebe è stata verificata anche attraverso l'analisi al microscopio elettronico.

## **6.8 Preparazione campioni per Microscopia Elettronica**

I campioni una volta prelevati vanno immersi immediatamente in provette di vetro contenenti il fissativo. Il fissativo per la microscopia elettronica è una soluzione al 2,5% in tampone fosfato Millonig a pH 7.1-7.2. I tempi di fissazione variano secondo lo spessore del campione; per una preparazione ottimale si preferisce non tenere in fissativo per più di 24 ore.

Una volta fissati, i campioni, devono essere post-fissati in tetrossido d'osmio, disidratati ed inclusi in resina, vengono poi lavati con 3 passaggi in tampone fosfato Millonig e, quindi post-fissati per 3 ore a +4°C in tetrossido d'osmio all'1%, poi lavati nuovamente in tampone fosfato e tenuti in frigo a +4°C per tutta la notte.

Il mattino successivo, dopo due ulteriori passaggi in tampone fosfato a temperatura ambiente, il campione è disidratato in una scala ascendente di acetone, poi posto in ossido di propilene puro.

Successivamente, il campione viene posto in soluzioni scalari di resina/ossido di propilene con successivo incremento della quota di resina fino a raggiungere l'80%.

La mattina successiva, il prelievo viene posto in resina pura, lasciato stazionare per 3 ore a temperatura ambiente, incluso e messo a polimerizzare in stufa a 70°C per 3 giorni.

## **7. RISULTATI E DISCUSSIONE**

## 7.1 Esito delle indagini microbiologiche ambientali

I risultati del monitoraggio ambientale, acquisiti e archiviati in un database, hanno rivelato la presenza di *Legionella* spp. in tutti i padiglioni del presidio ospedaliero. Nell'anno che ha preceduto l'attivazione di misure di controllo della colonizzazione microbica (Marzo 2002 – Marzo 2003) *Legionella* spp. è stata isolata in 54 degli 81 campioni analizzati (66,7%) e la carica batterica media nei campioni positivi è stata di 50352 UFC/l. Il 50,61% dei campioni analizzati mostrava una contaminazione >1000 UFC/l. Nei sette anni che hanno seguito l'applicazione delle misure di controllo, ovvero l'installazione dei generatori di biossido di cloro e successivamente i filtri ai punti d'uso terminali, i livelli di contaminazione microbica hanno mostrato una progressiva riduzione. Nel primo anno (Aprile 2003 – Marzo 2004) sono risultati positivi 29 campioni su 67 analizzati (43,3%), con una carica media di 31372 UFC/l; 23 campioni (34,3%) presentavano una carica superiore alle 1000 UFC/l. Nel secondo anno (Aprile 2004 – Marzo 2005) la positività ha riguardato 53 campioni su 126 (42,1%), con una carica media di 16060 UFC/l e una contaminazione superiore alle 1000 UFC/l in 40 prelievi (31,75%). Nel terzo anno (Aprile 2005 – Marzo 2006) sono risultati positivi 16 campioni su 74 analizzati (21,6%), con una carica media di 32650 UFC/l. I campioni con una carica superiore alle 1000 UFC/l sono stati 9 (12,2%). Nel quarto anno (Aprile 2006 – Marzo 2007) su 216 campioni 46 sono risultati positivi (21,3%) e la carica media è stata di 12639 UFC/l. La contaminazione >1000 UFC/l ha riguardato 24 campioni (12,7%). Nel quinto anno di sorveglianza (Aprile 2007 – Marzo 2008) i campioni positivi sono stati 20 su 111 (18%), e tutti con più di 1000 UFC/l, mentre la carica media è stata di 39595 UFC/l. Dopo il sesto anno dall'inizio della sorveglianza (Aprile 2008 – Marzo 2009) sono risultati positivi 24 su 111 campioni (21,6%) di cui 21 con carica >1000 UFC/l e valori di carica media di 52000 UFC/l. Ad oggi, dopo sette anni di

monitoraggio (Aprile 2009 – Marzo 2010), i campioni positivi sono stati 16 su 66 (24,1%), tutti con carica >1000 UFC/1 (Figura 11).

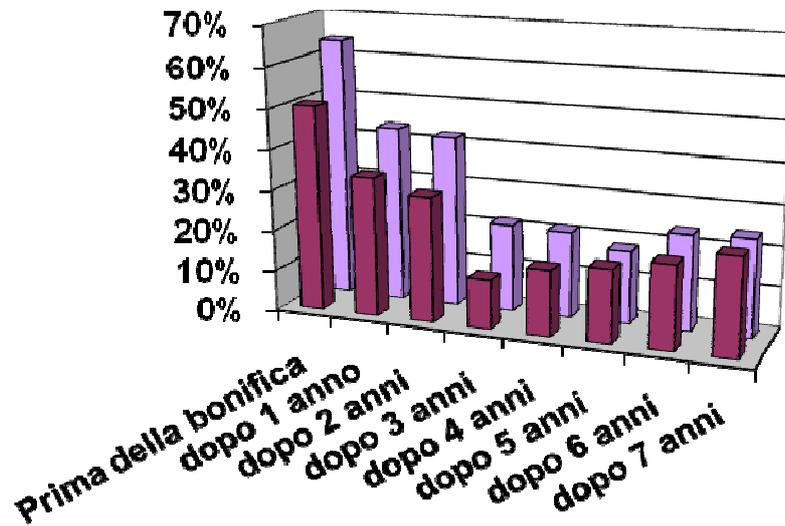
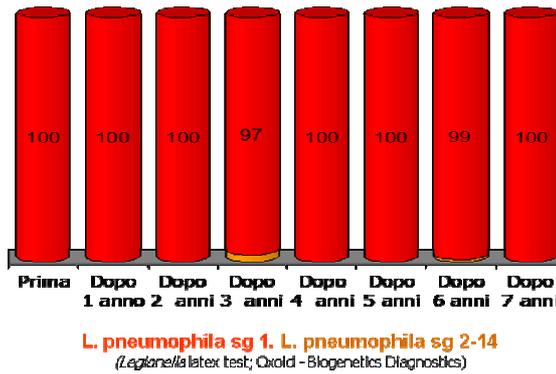


Figura 11: Variazione nel tempo delle percentuali dei siti positivi per *Legionella* spp. (■) e delle cariche medie >10<sup>3</sup> UFC/1 (□) di tutti i campioni analizzati.

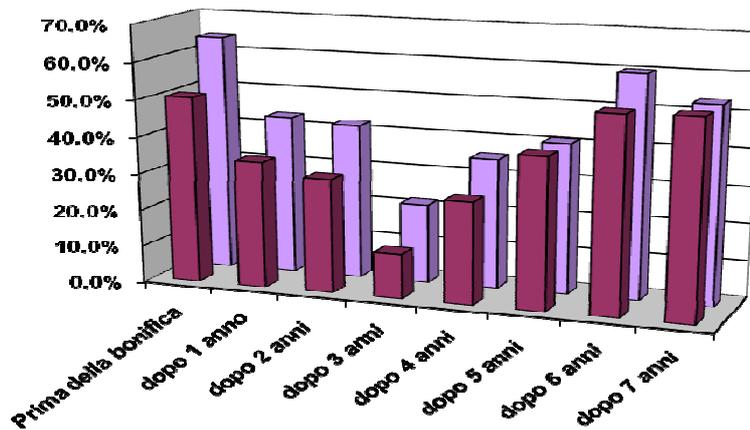
I dati sopra riportati sono globali, cioè includono i risultati di tutti i prelievi effettuati ai punti d'uso delle Unità operativa prese in esame. La riduzione della percentuale di positività è risultata statisticamente significativa ( $p < 0.03$ ).

La tipizzazione sierologica ha rilevato come tutti i ceppi batterici isolati, tranne 4, risultassero *Legionella pneumophila* sierogruppo 1 come illustrato in figura 12.



**Figura 12: Frequenza di isolamento di *Legionella* spp. nei quattro padiglioni del Presidio Ospedaliero. Dati totali relativi a 276 campioni positivi per *Legionella* spp.**

Per contro, restringendo l'analisi ai campioni prelevati ai punti d'uso a cui non erano stati applicati i filtri terminali, si osserva dopo un'iniziale fase di riduzione un'inversione di tendenza a partire dal quarto anno. L'incidente alla rete acquedottistica giustifica l'incremento della percentuale di positività dei siti terminali per la ricerca di *Legionella*. Nel quarto, quinto, sesto e settimo anno infatti la positività risale dal 21,6% del terzo anno rispettivamente al 35,4% (45/127 campioni) e al 40,8 % (20/49 campioni), al 53,3% (24/45) e al 56,3 (18/32) (Figura 13).



**Figura 13: Variazione nel tempo della percentuale di positività e delle cariche medie dei campioni analizzati per la ricerca di *Legionella* spp. provenienti dai siti privi di filtro.**

- Percentuale di positività delle cariche microbiche >10<sup>3</sup>
- UFC/l Percentuale dei siti positivi per *Legionella* spp.

Esiste quindi una differenza a seconda che si considerino i dati derivati da un approccio integrato di disinfezione-filtrazione oppure i dati provenienti esclusivamente da campionamenti di punti d'uso sprovvisti di filtro. Comunque, da entrambe le valutazioni emerge che in tre si è avuta una diminuzione della percentuale di positività dei siti distali nel corso degli anni successivi alla messa in opera di misure di controllo della colonizzazione microbica. La maggior quota di positività che influenza la tendenza alla risalita si è avuta in un solo padiglione (Figura 14).

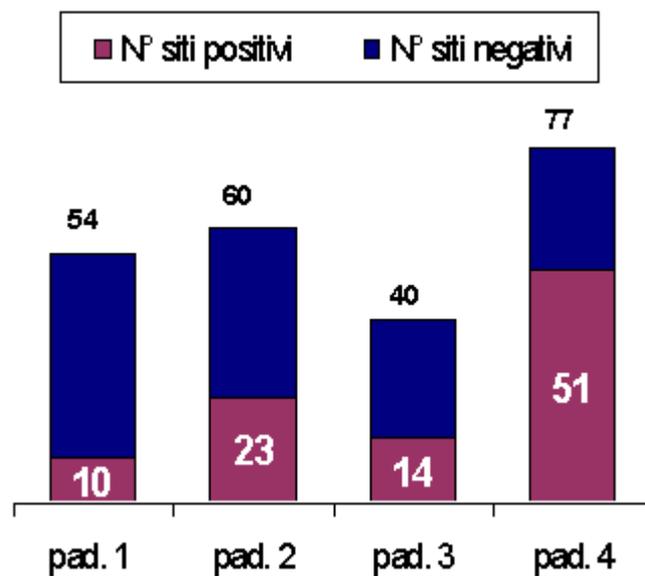


Figura 14: numero dei siti positivi per edificio sul totale dei campionamenti negli ultimi tre anni da campionamenti in punti d'uso privi di filtro.

Questi dati suggeriscono che esistono delle criticità strutturali intrinseche dell'edificio in questione, forse per la maggior parte attribuibili al mancato raggiungimento locale di adeguate concentrazioni di cloro. Infatti la misura di libero residuo ai punti terminali di uso al momento della raccolta dei campioni di acqua calda ha evidenziato che per l'edificio 4, quello caratterizzato da una maggiore contaminazione, i valori cloro libero oscillavano tra i 0,18 e 0,05ppm, contro gli 0,1 e 0,25 ppm riscontrati per gli altri edifici.

La strategia di gestione del rischio applicata in questa Azienda ha previsto provvedimenti di disinfezione della rete idrica mediante biossido di cloro a partire da Aprile 2003. Sulla base della mancata eradicazione della colonizzazione microbica, legata a diversi fattori (problematiche strutturali, eventi accidentali, etc.), la strategia è stata integrata con l'installazione di sistemi filtranti. L'installazione dei filtri ha riguardato i punti d'uso dei reparti giudicati ad elevato rischio (oncologia, ematologia, chirurgia dei trapianti, etc), con utilizzo di membrane con 0,2µm di porosità in grado di garantire un'acqua di qualità molto elevata da un punto di vista microbiologico, che infatti è risultata costantemente priva di contaminazione da *Legionella pneumophila* e da altri agenti batterici. I parametri che sono stati presi in considerazione sono quelli proposti sia dalle linee-guida di Allegheny County (con valutazione della percentuale di siti positivi, con soglia del 30%) sia quelli delle linee-guida italiane (dunque i valori della carica batterica al punto d'uso, espressi in UFC/l – Tabella 1.

Concentrazione di <i>L. pneumophila</i> [UFC/L]	Misure da intraprendere
< 100 UFC/L	Legionella spp. « <b>non rilevabile</b> », valore soglia per le U.O. che ospitano pazienti a rischio (terapie intensive, trapianti, oncologie, neonatologie, ..)
100-1000 UFC/L	Continuare la sorveglianza
da 1000 a 10.000 ≤ 30% prelievi positivi	Effettuare nuovi prelievi e rivalutazione delle misure di controllo ed applicazione di eventuali misure correttive
10.000 e/o ≥ 30% prelievi positivi	Effettuare nuovi prelievi e procedere immediatamente ad una valutazione del rischio e delle misure e delle misure di controllo al fine di identificare le misure correttive.

**Tabella 1.** Interpretazione dei risultati dei campionamenti ambientali.

I risultati di 8 anni di monitoraggio ambientale mostrano che tutti i padiglioni esaminati presentano una colonizzazione da *Legionella pneumophila* sierogruppo 1 (quattro campioni su 852 esaminati sono

risultati positivi per *L. pneumophila* sg. 2-14). I risultati delle analisi condotte sulla totalità dei prelievi, in presi in esame in Figura 12, dimostrano come l'approccio integrato sia stato in grado di ridurre la percentuale di positività dei siti distali per la ricerca di *Legionella pneumophila* dal 64% al 24% in modo statisticamente significativo ( $p < 0.03$ ), e come l'andamento in discesa sia stato mostrato in tutti i 8 anni successivi all'applicazione di misure di controllo della colonizzazione microbica. Esaminando i dati provenienti esclusivamente da siti sprovvisti di sistemi filtranti i risultati si discostano dai dati totali a partire dal quarto anno dopo la messa in opera della clorazione in continuo. Infatti si osserva un incremento della percentuale di positività per la ricerca di *Legionella* spp. nel penultimo e ultimo anno, con valori rispettivamente del 53% e del 56% (Figura 13). Sono molteplici gli elementi che potrebbero spiegare un simile andamento. In primo luogo, durante il quarto anno di monitoraggio è insorto un evento catastrofico a carico della rete acquedottistica, in corrispondenza del quale la rete è stata invasa da materiale sedimentabile. Sebbene sia stata effettuata un'accurata pulizia e disinfezione della rete idrica si è comunque verificato un certo grado di contaminazione microbica della rete, che potrebbe essersi ripercosso anche sull'andamento del quinto anno di monitoraggio. In secondo luogo, un ulteriore elemento viene fornito dall'analisi dei dati divisi per edificio (Figura 14).

Infatti è possibile notare come mentre in tre edifici sia stato ottenuto un controllo della contaminazione microbica, con riduzione delle percentuali di positività dei siti distali, in un edificio ciò non si sia verificato. Proprio questo dato incide fortemente sull'andamento in risalita della percentuale di positività globale dei prelievi effettuati in punti d'uso sprovvisti dei filtri che si osserva negli ultimi anni. Una simile evenienza è spiegabile in almeno due modi. Innanzitutto, è possibile che complessità strutturali peculiari dell'edificio in questione abbiano determinato sia una proliferazione batterica, sia una riduzione della concentrazione locale del biossido di cloro. L'eventuale presenza di "bracci morti" infatti determina ristagno dell'acqua, condizione ottimale per la proliferazione dei batteri

inglobati dalla matrice extracellulare del biofilm. L'assenza di flusso determina inoltre scarso ricambio del disinfettante presente nelle condutture che viene quindi progressivamente consumato. In secondo luogo, è possibile che la clorazione nell'edificio considerato non sia stata ottimale; dunque i bassi livelli di cloro potrebbero aver permesso la proliferazione batterica in quella struttura. Da entrambe le eventualità considerate emerge come la continua manutenzione sia uno strumento prezioso per il controllo della flora idrodiffusa anche quando siano state impostate misure di sanificazione.

La politica integrata di gestione del rischio idrico applicata nel presidio ospedaliero oltre a ridurre significativamente la percentuale di siti positivi e la carica microbica, ha permesso di prevenire ulteriori casi di legionellosi nosocomiale. Il programma di monitoraggio ha dimostrato l'ubiquitarità di *Legionella pneumophila* sg 1, che, nonostante le procedure di disinfezione e bonifica della rete ormai persistenti da sette anni, continua ancora a colonizzare la rete di distribuzione dell'acqua del presidio ospedaliero.

## **7.2 Tipizzazione molecolare**

La sequenza del gene *mip* di tutti i 101 isolati studiati ha mostrato un'identità del 100% con quella di *L. pneumophila* ceppo *Wadsworth* nel database "*Legionella mip gene EWGLI Sequence Database*" ([www.ewgli.org](http://www.ewgli.org)) e con la sequenza pubblicata da Engleberg (Engleberg 1989). L'analisi dei profili di migrazione in PFGE ha mostrato 3 pattern diversi, arbitrariamente denominati pulsotipo 1, 2 e 3. Il pulsotipo 1 è stato rappresentato da 28 isolati (28%) e il pulsotipo 2 da 71 isolati (70%) (Figura 15). Entrambi sono stati rilevati in campioni provenienti da più Unità operative prelevati sia antecedentemente che successivamente ad aprile 2003. Il pulsotipo 3 è stato rappresentato da 2 soli isolati (2%), raccolti solo successivamente rispetto alla messa in opera della clorazione in continuo, e provenienti da una sola Unità Operativa...

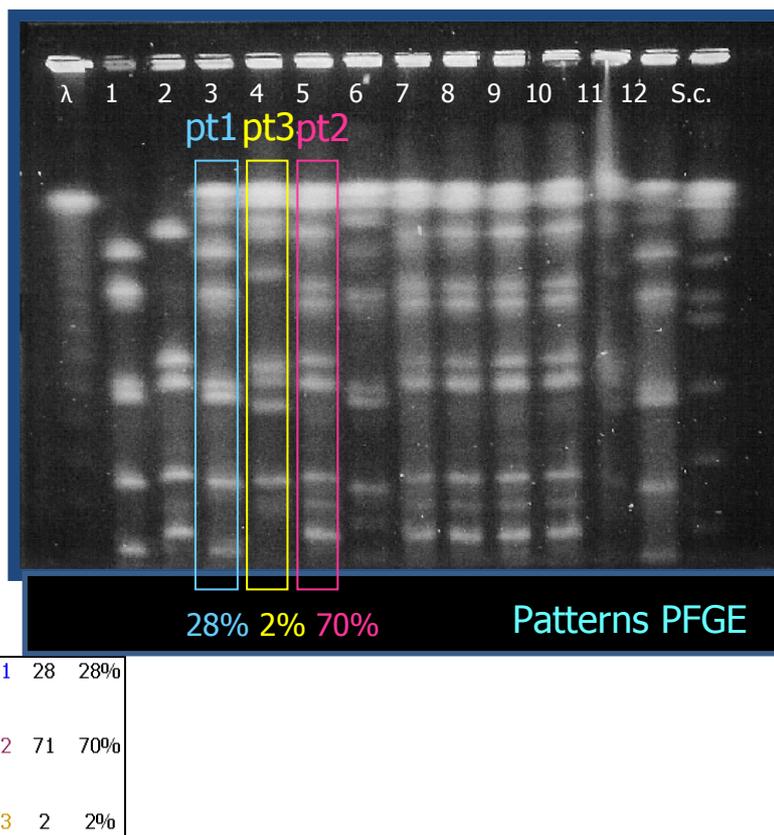


Figura 15: Patterns di PFGE e frequenza di isolamento dei tre pulsotipi

L'analisi filogenetica condotta ha permesso di dimostrare una maggiore similarità tra i pulsotipi 1 e 3 (coefficiente di similarità del 64%), mentre i pulsotipi 1 e 2 sono risultati filogeneticamente più distanti (coefficiente di similarità del 43%) (Figura 16).

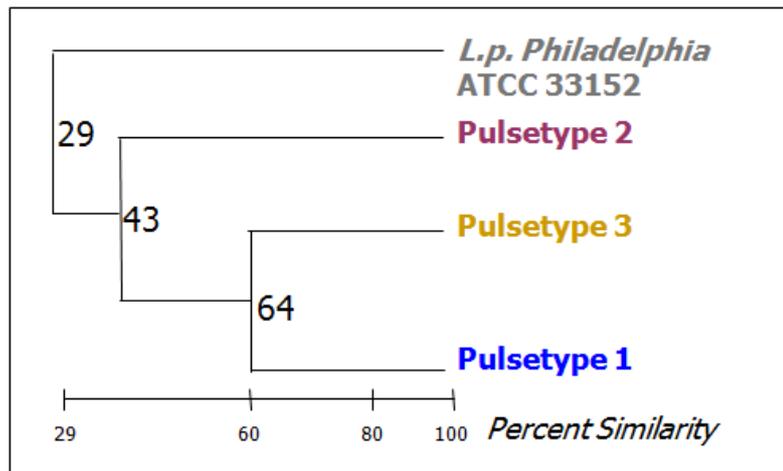


Figura 16: Percentuale di similarità tra i tre cloni isolati nella rete e il ceppo ATCC *Legionella pneumophila Philadelphia*; dati elaborati con il sistema Diversity Database, Bio-Rad, V. 0.2 (UPGAMA method)

L'analisi condotta con la SBT sugli stessi isolati analizzati con la PFGE ne ha confermato i risultati mostrando 3 sequence type (ST) ognuno corrispondente ad un pulsotipo dell'elettroforesi (Figura 17).

SB types	Allele							PFGE profile	Prevalence of genotypes
	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>momp<sub>S</sub></i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>		
657	2	10	3	3	21	4	11	Pulsetype 1	28 (28%)
269	7	10	17	3	13	11	11	Pulsetype 2	71 (70%)
-	2	10	15	3	9	4	11	Pulsetype 3	2 (2%)

Figura 17: Risultati complessivi delle due tecniche di tipizzazione e prevalenza dei cloni: numero del profilo allelico (*SB types*) e patterns di PFGE (*pulsotipo*). Il pulsotipo 3 non è stato associato ad alcun SB types

Il pulsotipo 2 è risultato corrispondere con un omologia di sequenza del 100% con il profilo SBT numero 269 (7,10,17,3,13,11,11) del database EWGLI. Il pulsotipo 1 ha mostrato un omologia del 100% con il profilo

SBT numero 657 (2,10,3,3,21,4,11), mentre il pulsotipo 3, isolato solo due volte, era caratterizzato da una sequenza allelica (2,10,15,3,9,4,11) non identificata con nessun SBT del database EWGLI. La sequenza del gene *mip*, identica in tutti gli isolati, ha confermato l'appartenenza di tutti gli isolati analizzati ad un unico ceppo, *L. pneumophila* ceppo Wadsworth, anche se l'allele 3 corrispondente al gene *mip* è comune ad altri ceppi di *L. pneumophila* come il ceppo *Knoxville* ATCC 33153. La distribuzione spazio-temporale dei cloni 1 e 2, risultati filogeneticamente distanti tra loro, è variata nel corso degli anni successivi all'applicazione del piano di gestione del rischio idrico (Figura 18).

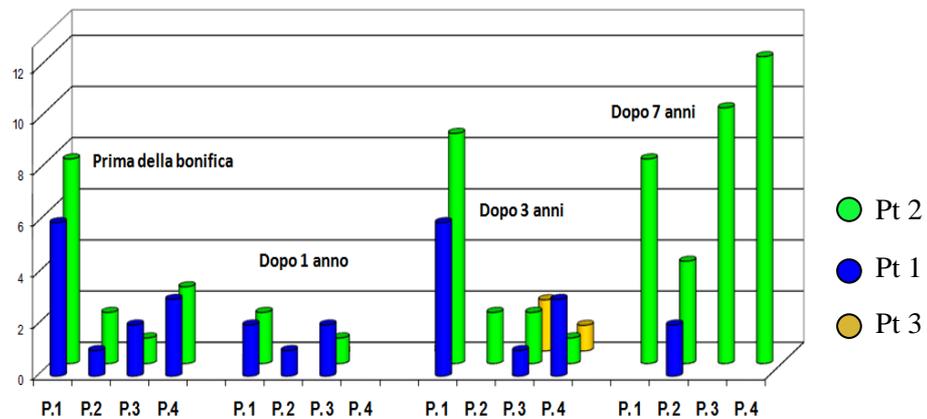


Figura 18: Variazione della distribuzione spazio-temporale dei cloni di *L. pneumophila* Wadsworth nei padiglioni esaminati

Nell'ambito infatti dei 101 isolati batterici analizzati, il clone 1 è stato identificato in campioni provenienti da 7 Unità operative. prima della clorazione e da 10 Unità operative dopo la messa in opera della clorazione. Anche il clone 2 è stato isolato da campioni provenienti da più Unità operative sia prima sia dopo la messa in opera dell'iperclorazione (8 Unità operative. prima e 7 dopo). Il clone 3 invece è risultato filogeneticamente vicino al clone 1 con una percentuale di similarità del 64% ma lontano dal clone 2 (percentuale di similarità del 43%), ed è stato isolato esclusivamente da campioni prelevati successivamente all'installazione dei generatori (anno 2004), ed in una singola U.O. Nello schema riportato in Figura 14 viene

riportata la distribuzione dei diversi cloni esaminati nelle Unità operative. e nel tempo. Sono numerose le evidenze in letteratura che descrivono la persistenza di uno o più cloni all'interno degli impianti idrici. In uno studio condotto tra il 1987 e il 1997 sono stati tipizzati con PFGE 75 ceppi di *Legionella pneumophila* sg 1 isolati da altrettanti campioni clinici in 24 ospedali diversi situati attorno all'area di Parigi; parallelamente anche 64 isolati ambientali, mai stati associati a casi umani e raccolti tra gli anni 1986 e 1997 sono stati tipizzati. I risultati hanno indicato che il 33% degli isolati clinici e il 25% dei ceppi ambientali appartenevano allo stesso clone (Lawrence, 1999). La predominanza clinica di questo particolare clone potrebbe essere spiegata da una maggiore abbondanza nelle reti di distribuzione attorno all'area di Parigi e dalla sua maggior virulenza (Aurell 2003). In un analogo studio condotto tra il 1989 e il 2006 è stato dimostrato che, nonostante le procedure di disinfezione, alcuni cloni erano in grado di persistere nell'impianto idrico fino a 17 anni (Garcia-Nuñez 2007) avanzando l'ipotesi che fenomeni di tolleranza ai biocidi potessero essere inclusi tra i fattori responsabili della continua colonizzazione e del persistere di casi di legionellosi. Infine, nel 1981 si verificò un'epidemia di legionellosi nosocomiale che colpì 24 pazienti causata da un clone prevalente nella rete idrica che, nonostante il successivo intervento di bonifica, è stato la causa di ulteriori cluster negli anni successivi (Rangel-Frausto 1999).

I motivi di questa persistenza potrebbero essere imputabili alla flessibilità del ciclo replicativo di *Legionella* spp. che implica due fasi: la fase di replicazione e la fase di trasmissione. Questo comporta che il batterio possieda una notevole plasticità genetica, in grado di garantire l'adattamento a variate condizioni ambientali, attraverso la regolazione di tratti fenotipici associati alla capacità di infettare l'ospite (Byrne 1998).

In questo studio, dalla tipizzazione molecolare effettuata su 101 isolati, è emerso come nel presidio ospedaliero siano identificabili e variamente distribuiti 3 cloni batterici appartenenti ad un unico ceppo, *L. pneumophila* ceppo Wadsworth. L'analisi filogenetica ha dimostrato una

maggior vicinanza tra il clone 1 ed il clone 3, mentre il clone 2 è risultato distante da entrambi. Il clone 1 è risultato presente in numerose unità operative sia prima sia dopo l'impostazione della clorazione in continuo. Il clone 3 al contrario è stato identificato solo in campionamenti successivi alla messa in opera della clorazione in continuo, ed essendosi presentato solo quattro è stato considerato sporadico e quindi non è stata in seguito indagata la sua virulenza. Il clone 2 ad oggi risulta essere il ceppo prevalente su diversi edifici. Su entrambi i cloni, 1 e 2, isolati sia antecedentemente sia successivamente alla installazione dei generatori di biossido di cloro, sono state quindi condotte delle prove di cloro-sensibilità, che potrebbero spiegare la maggiore prevalenza di uno clone rispetto all'altro, oltre che confermare la presenza di fenomeni di cloro-tolleranza attribuibili alla mancata eradicazione.

### **7.3 Prove di cloro-sensibilità**

Le prove di cloro-sensibilità (Figura 20) hanno mostrato una diversa suscettibilità dei cloni al disinfettante, mentre gli stessi cloni non esposti al trattamento con il cloro non hanno mostrato alcuna riduzione della carica microbica. Il ceppo di controllo *L.p.* ATCC 33152 ha mostrato una maggiore sensibilità, raggiungendo una riduzione significativa della carica microbica dopo 60 minuti di esposizione ad acqua clorata, con un abbattimento pari a 5 log (99,999%). Riduzioni analoghe sono state osservate a 60 minuti di trattamento sia per il clone 1 (R = 5 log) che per il clone 2 (R = 4,45 log) isolati prima dell'installazione dei generatori di biossido di cloro. I cloni 1 e 2 isolati dopo gli interventi di bonifica mostravano riduzioni rispettivamente pari a 0,87 log e 0,75 log dopo 30 minuti; dopo 60 minuti di esposizione sono stati registrati valori di riduzione delle cariche rispettivamente di 2,56 log e 2,41 log. Tutti i ceppi hanno mostrato una riduzione significativa pari a 5 log dopo 120 minuti, eccetto il clone 2 post-bonifica, che era ancora evidenziabile in coltura (R = 4,6 log).

I ceppi batterici che non sono mai stati esposti al cloro (ATCC 33152) sembrano rispondere all'attività battericida del disinfettante in maniera analoga ai ceppi di *Legionella* isolati prima della clorazione in continuo, che peraltro sono stati isolati dalla rete idrica contenente per legge (DL 31/2001) valori di cloro libero pari a 0,2 ppm.

L'analisi del profilo di cloro-sensibilità condotta sui due cloni ha dimostrato caratteristiche sovrapponibili di cloro-tolleranza. In particolare, le cinetiche di riduzione delle cariche nei cloni 1 e 2 isolati prima della clorazione in continuo erano del tutto simili; in modo analogo anche le curve di abbattimento nei cloni 1 e 2 isolati dopo la bonifica sono risultate sovrapponibili. Sulla base di questi risultati la maggiore frequenza di isolamento dai padiglioni in esame di un clone rispetto all'altro non è imputabile a fenomeni di cloro-tolleranza. Tuttavia dalle prove è emersa una differenza apprezzabile tra le curve di abbattimento della carica microbica tra i ceppi isolati prima e quelli rinvenuti dopo la clorazione in continuo (Figura 19).

Sebbene l'allestimento delle prove di suscettibilità abbia dimostrato delle criticità, in particolare per quello che riguarda la preparazione dell'acqua clorata (pH e temperatura influenzano l'attività del cloro), il mancato utilizzo, per motivi di sicurezza, del biossido di cloro e le condizioni *in vitro* pur sempre dissimili da quelle *in vivo*, il protocollo adottato sembra essere una buona approssimazione per lo studio dell'effetto del cloro su *L. pneumophila*. Alla luce dei risultati ottenuti, è ipotizzabile che si sia verificato negli anni un certo grado di adattamento o tolleranza dei ceppi presenti in rete nei confronti del cloro.

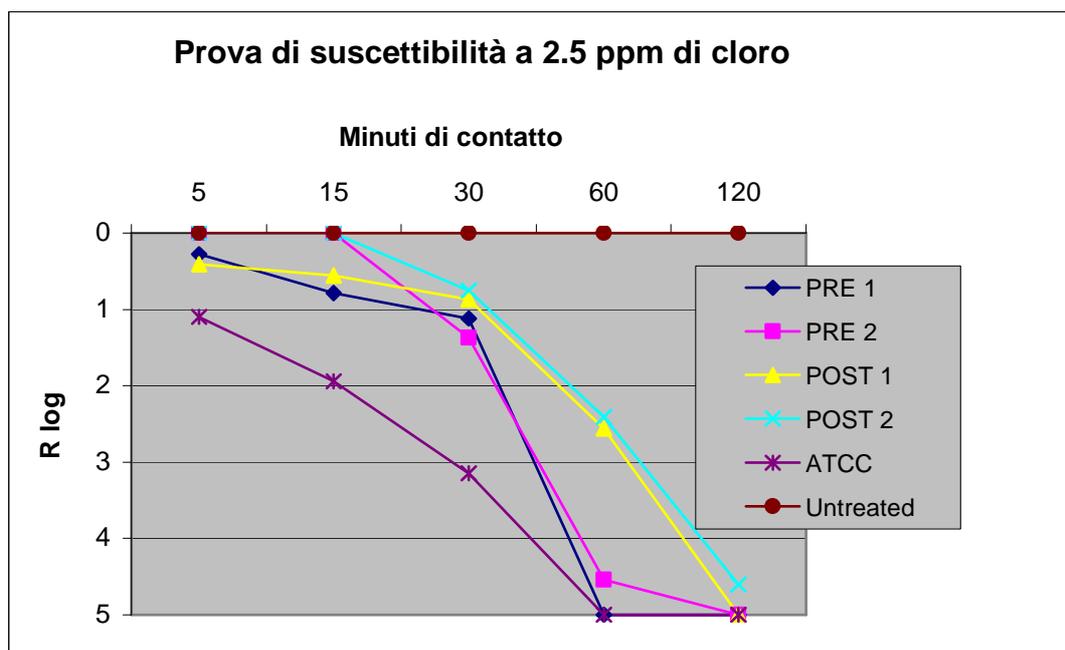


Figura 19: Riduzione logaritmica della carica microbica in funzione dei minuti di contatto dovuta all'attività battericida del cloro 2,5 ppm sui cloni 1 e 2 isolati prima (PRE) e dopo (POST) la bonifica e su *L. pneumophila* Philadelphia (ATCC)

#### 7.4 Analisi dei profili d'espressione

L'analisi dei profili di espressione dei geni presi in esame ha indicato diversi livelli di attivazione per ogni differente tempo di contatto con il cloro attivo a 2,5 ppm (Figura 20).

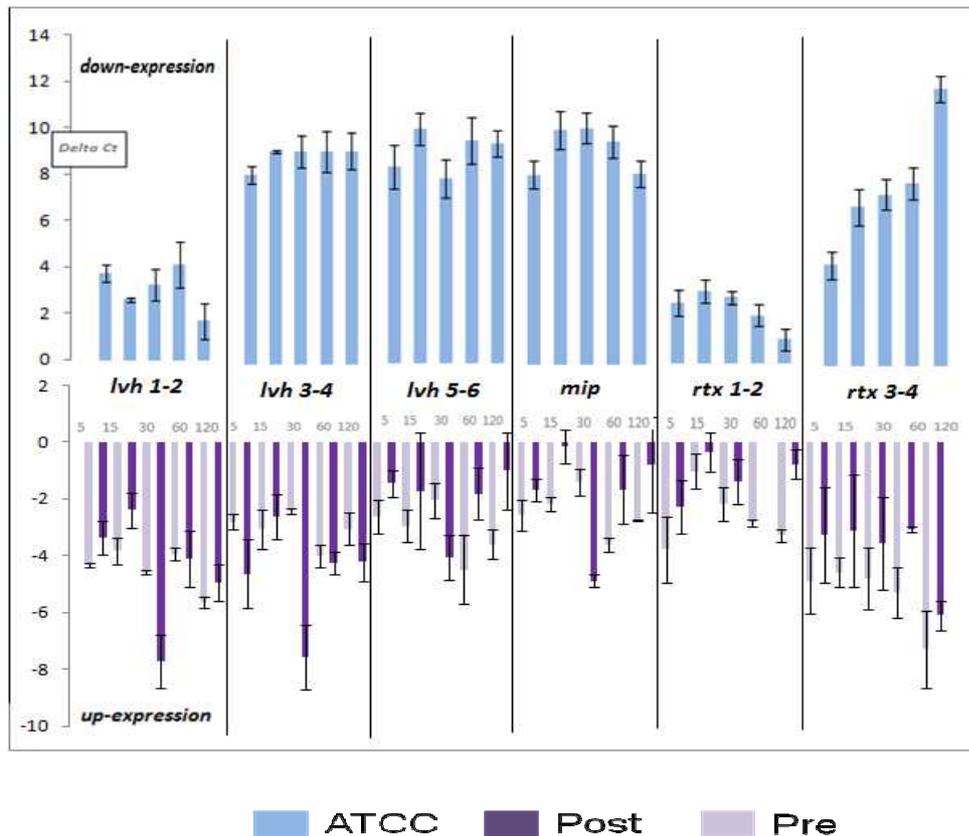


Figura 20: profili di espressione dei geni di virulenza in funzione dei minuti di esposizione all'attività battericida del cloro (2,5 ppm): i valori in positivo indicano una sotto-espressione, mentre i valori in negativo indicano una sovra-espressione dei geni

I ceppi di *Legionella pneumophila* isolati sia antecedentemente che successivamente l'installazione dei generatori di biossido di cloro hanno rilevato una sovra-espressione dei geni di virulenza in corrispondenza di ogni tempo di trattamento, mentre il ceppo ATCC *L. pneumophila* Philadelphia ha mostrato una sotto-espressione. La mancata esposizione al cloro non ha determinato alcuna variazione dell'espressione negli stessi ceppi non trattati.

I ceppi batterici, che erano presenti in rete prima dell'applicazione della clorazione, esprimono in modo massimale la porzione 1-2 del locus genico *lvh* dopo 120 di esposizione al cloro, in particolare la regione risulta essere attivata 50 volte in più rispetto al non trattato; la porzione 3-4 raggiunge un picco massimo di attivazione a 60 minuti, 16 volte in più rispetto al non trattato; il picco massimo di espressione della porzione 5-6

veniva raggiunto dopo 60 minuti ed era espressa 23 volte di più. Per il gene *mip* il valore di attivazione più alto indicava che era attivato 12 volte in più rispetto al non trattato dopo 60 minuti. Infine le regioni *rtx 1-2* e *3-4* raggiungevano picchi massimi di espressione rispettivamente dopo 5 minuti (incremento di 14 volte) e dopo 120 minuti (incremento di 155 volte).

Nei ceppi isolati dopo gli interventi di bonifica, i valori massimi di espressione del locus *lvh* sono risultati a 30 minuti pari a 209 volte in più rispetto al non trattato per la porzione *1-2*, 191 volte in più la porzione *lvh 3-4* e 17 volte di più per la porzione *5-6*. Anche per il gene *mip* l'espressione più alta veniva raggiunta dopo 30 minuti e il gene era sovra-espresso 29 volte in più. Analogamente a quanto risultato per i ceppi isolati prima della clorazione, le regioni *rtx 1-2* e *3-4* venivano attivate rispettivamente dopo 5 minuti (incremento di 4 volte) e dopo 120 minuti (incremento di 66 volte). Il ceppo ATCC di *L. pneumophila* Philadelphia è risultato sotto-espresso per tutti i geni considerati nei vari tempi di contatto.

Attualmente, le conoscenze sulla possibile regolazione dell'espressione di geni di virulenza da parte di agenti disinfettanti come il cloro, sono limitate. In questo studio, si è dimostrato che i ceppi ambientali, isolati nel periodo pre- e post-bonifica, sovra-esprimono tutti i geni di virulenza presi in esame se esposti per tempi diversi all'attività battericida del cloro; in particolare, i ceppi di *L. pneumophila* Wadsworth isolati dopo la clorazione in continuo, sono in grado di rispondere al trattamento attivando i geni molto più precocemente e più marcatamente rispetto ai ceppi presenti nella rete prima della bonifica. Infatti le regioni codificanti il sistema di secrezione di tipo IVA (locus *lvh*) sono espresse da 1,6 a 3,2 volte in più nei ceppi post-clorazione già dopo 30 minuti di cloro-trattamento. Di fatto, *L. pneumophila* è in grado di utilizzare i suoi sistemi di secrezione, compreso il tipo IVA, entro pochi minuti dall'internalizzazione (Lu 2005): il batterio, dopo l'ingresso nella cellula ospite, rilascia una serie di fattori di virulenza, attraverso i sistemi di secrezione, che determinano una profonda alterazione del "trafficking" intracellulare, inibendo la formazione del fagolisosoma. Sebbene siano vari i sistemi di secrezione che

*L. pneumophila* possiede, il sistema definito Dot/Icm (defect in organella trafficking/intracellular multiplication) e il tipo IVA (*locus lvh*) sono quelli maggiormente implicati nell'infezione di protozoi e macrofagi; da un recente studio (Ridenour 2003) si comprende che, quando la temperatura è inferiore ai 30°C, il sistema di secrezione codificato dal locus *lvh* viene attivato, e ciò sembra garantire un incremento delle capacità di *L. pneumophila* di entrare e di replicarsi all'interno delle cellule ospiti. Questo fenomeno riflette il ruolo importante nell'infezione di protozoi che il sistema di tipo IVA può ricoprire a livello ambientale, in cui le temperature sono spesso minori di 30°C. Dai risultati di questo studio, seppur preliminari, si è compreso come regioni del locus *lvh*, vengano espresse più attivamente a seguito dell'azione di elevate concentrazioni di cloro. In un recente studio (Hindr  2008)   stata valutata l'influenza del ferro sulla formazione del biofilm all'interno della rete idrica, e da questo emerge come i profili trascrizionali di alcuni geni (*pvcAB* e *ahpC2D*) implicati nella protezione delle cellule da stress ossidativi risultino attivati in presenza di alte concentrazione del metallo e in presenza di perossidi, quest'ultimi utilizzati anche nella disinfezione delle acque.

Il gene *mip*, il cui prodotto   coinvolto nel prime fasi dell'infezione (Cianciotto 1989), ha raggiunto un picco massimo di espressione dopo 30 minuti di esposizione ad acqua clorata ed   risultato sovra-espresso 3,5 volte in pi  nei ceppi isolati dopo l'adozione degli interventi di bonifica.

L'attivazione di questi geni di virulenza permette quindi a Legionella di parassitare le cellule ospiti, in cui il batterio, grazie alla presenza di numerosi nutrienti,   in grado di replicarsi abbondantemente, sottraendosi cos  all'azione dei biocidi. La massiccia replicazione di Legionella, l'accumulo di metaboliti e la successiva carenza di nutrimento, sono sufficienti per innescare lo switch fenotipico verso la fase di trasmissione a nuove cellule ospiti. Dai risultati di un recente studio (Young-Gao 2000)   emerso come la morte di *Acanthamoeba polyphaga* infettata da *L. pneumophila* sopraggiunga per necrosi indotta dalla stessa Legionella, grazie all'attivazione dell'espressione di geni implicati nella formazione di

pori a livello della membrana cellulare, attività inibita nella fase di moltiplicazione (Harb 2000). L'attivazione del gene *rtxA*, il cui prodotto è implicato maggiormente nella formazione di pori, avviene più tardivamente durante il ciclo di replicazione (Cirillo 2000, Lu 2005). In accordo con l'espressione dei tratti associati alla fase di rilascio di Legionella, in questo studio è stato evidenziato che la regione *rtxA* raggiunge, sia nei ceppi pre-bonifica che nei post-bonifica, picchi massimi di attivazione dopo 120 minuti di cloro-trattamento.

Alla luce dei risultati ottenuti nello studio dell'espressione genica, si può ipotizzare che, *L.pneumophila* Wadsworth continuamente sottoposta all'azione del cloro, sia in grado di rispondere all'azione del biocida, incrementando le proprie capacità di parassitare le cellule ospiti. Tuttavia Legionella è capace anche di entrare in uno stato vitale ma non coltivabile (VBNC) a seguito dell'esposizione al disinfettante, come dimostrato da Alleron per la monoclorammina (Alleron 2008). Le indagini colturali condotte durante questo studio, possono confermare che il cloro attivo è in grado di indurre la comparsa di questo stato: sebbene i ceppi isolati prima della clorazione in continuo non siano in grado di formare colonie dopo l'esposizione di 60 minuti a 2,5 ppm di cloro, è possibile confermare la loro vitalità mediante lo studio dell'espressione genica, che proprio in corrispondenza di tale esposizione risulta massima. Contrariamente, la popolazione microbica di Legionella che attualmente colonizza la rete, mostra una riduzione logaritmica minima della carica microbica pari a 0,75 log dopo 30 minuti di esposizione, proprio laddove l'espressione dei geni di virulenza è massima.

Si può concludere che, ai fini di una corretta valutazione del rischio, la risposta di *Legionella* spp. al cloro dovrebbe essere tenuta in debita considerazione; infatti se prima della clorazione in continuo, la popolazione microbica mostrava una maggiore suscettibilità all'azione del disinfettante, oltre che la capacità di entrare in uno stato vitale ma non coltivabile, successivamente i ceppi batteri hanno rivelato una maggiore tolleranza ed una maggiore capacità di infezione della cellula ospite attraverso

l'espressione di tratti di virulenza, di cui il cloro è ipotizzabile possa essere un attivatore. Il parassitismo intracellulare garantirebbe una maggiore capacità di resistere all'attività del disinfettante.

Sembra quindi che l'adozione della clorazione in continuo come misura di controllo della colonizzazione microbica, abbia avuto a lungo termine degli effetti considerevoli nei confronti della popolazione di *Legionella* spp., incrementando le sue capacità di persistenza all'interno della rete idrica del presidio ospedaliero.

### 7.5 Analisi della capacità di infezione

I valori delle cariche microbiche di *L. pneumophila*, espresse in UFC/ml, derivate dalla crescita intracellulare di Legionella all'interno di *A. polyphaga* per i diversi tempi di incubazione sono indicati nella tabella 2.

Le prove di infettività di *L.p.* Wadsworth in *A. polyphaga* hanno confermato la capacità dell'ameba di internalizzare le legionelle, come rilevato dalle immagini ottenute alla microscopia elettronica (Fig:22, 23, 24, 25).

I ceppi di Legionella presi in considerazione, corrispondenti ad isolati prelevati prima e dopo l'applicazione della clorazione in continuo dell'acqua calda sanitaria, hanno mostrato una diversa capacità di moltiplicarsi nell'ospite. Dopo una fase iniziale, nella quale sia il ceppo isolato prima che quello isolato dopo la bonifica hanno mostrato la stessa capacità di moltiplicarsi all'interno dell'ameba, con un incremento della carica batterica di oltre un logaritmo, nelle fasi finali dell'infezione, solo il ceppo post-bonifica ha mantenuto tale caratteristica (Fig. 21).

ceppi	Tempo di co-infezione			
	0h	2h	24h	48h
<b>PT2 PRE</b>	5.3E+02	9.9E+03	7.1E+03	2.8E+03
<b>PT2 POST</b>	5.4E+02	6.3E+03	1.5E+04	1.5E+04

Tabella 2: Valori cariche microbiche e tempi di incubazione

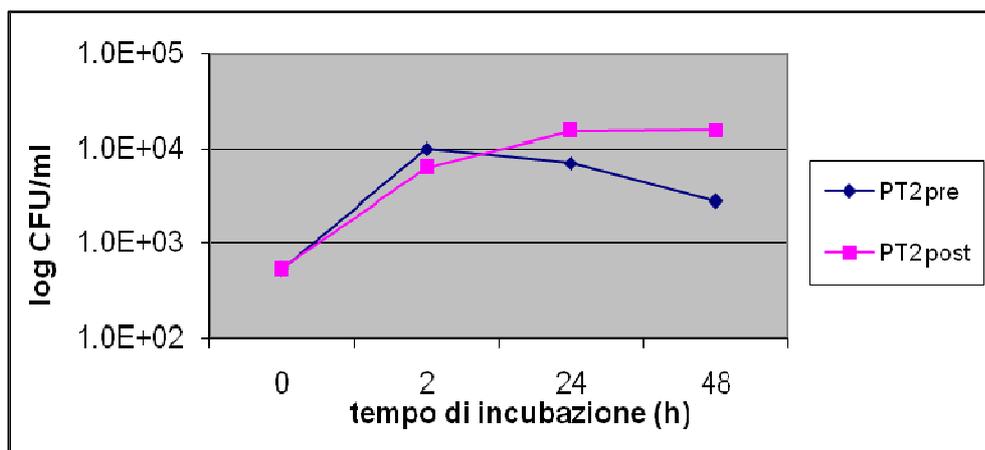


Figura 21: Tempi di incubazione e cariche microbiche

I risultati ottenuti potrebbero essere condizionati dalla metodologia utilizzata per ottenere la lisi delle amebe. Alcuni autori (Bozue 1996, Moffat 1992, Cirillo 1999), operano la lisi meccanica delle amebe infette attraverso il passaggio ripetuto in ago da 27G. In un recente studio (García 2007), la liberazione di Legionella da parte di *A. polyphaga* viene realizzata mediante l'utilizzo del Triton X-100 allo 0,05 % v/v, detergente al quale tuttavia risulta sensibile anche Legionella.

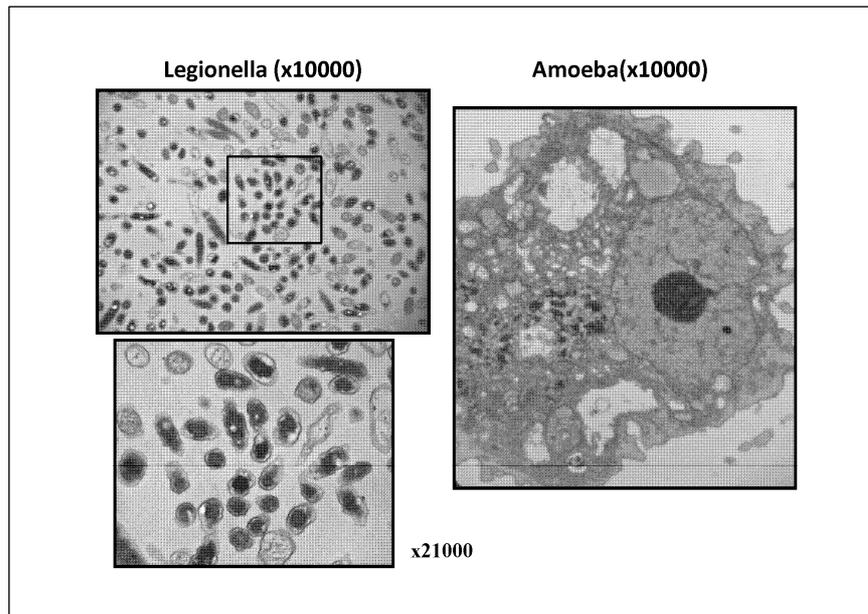


Figura:22 Legionella e Amoeba (foto Microscopia Elettronica)

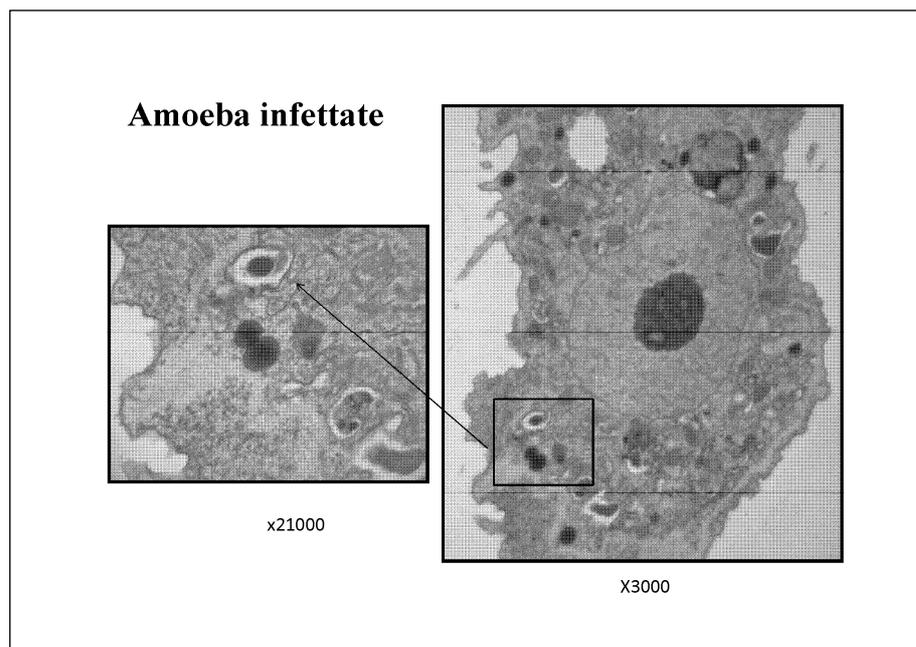


Figura: 23 Amoeba infettate (foto Microscopia Elettronica)

### Amoebe infettate

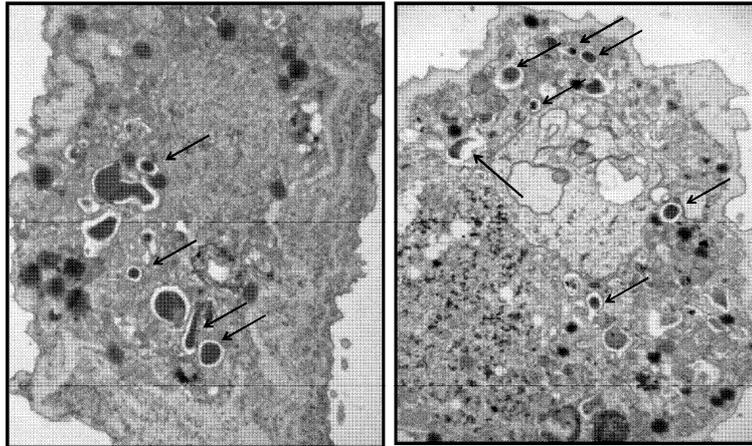
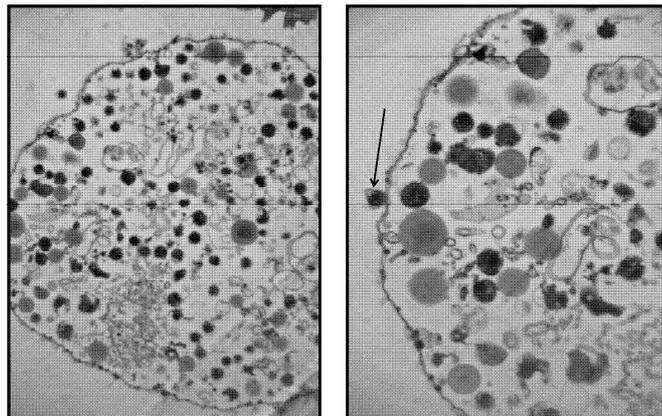


Figura: 24 Amoeba infettate (foto Microscopia Elettronica)

### Amoebe morte



X10000

x21000

Figura: 25 Amoeba morte (foto Microscopia Elettronica)

## 8. CONCLUSIONI

Negli anni successivi alla scoperta di *Legionella* spp., si è compreso come i casi di legionellosi nosocomiale derivassero dalla esposizione alla nebulizzazione di acqua contaminata attraverso i sistemi di climatizzazione, i condensatori evaporativi e le torri di raffreddamento. In seguito sono state riconosciute altre importanti fonti di esposizione: l'acqua calda sanitaria, l'acqua di rubinetto usata per procedure assistenziali, per l'igiene personale e per la preparazione degli alimenti.

E' infatti emerso da numerosi studi condotti in vari Paesi che negli ospedali le cui reti idriche non risultano contaminate da *Legionella* non si verificano casi di legionellosi nosocomiale. Parimenti, per i casi accertati di legionellosi nosocomiale, è risultato possibile risalire alla fonte di trasmissione grazie agli studi di biologia molecolare, che hanno permesso di ricostruire di volta in volta la catena epidemiologica mostrando una totale sovrapposibilità tra i ceppi clinici, isolati dai pazienti, ed i ceppi ambientali, presenti nelle reti idriche ospedaliere.

La problematica delle infezioni nosocomiali da *Legionella* spp. è complessa da gestire, e questo per diverse ragioni. Innanzitutto, questo batterio è praticamente ubiquitario in tutti gli ambienti acquatici, e le sue condizioni di crescita ottimali sono quasi sempre sovrapposibili a quelle che si ritrovano all'interno delle reti di distribuzione dell'acqua calda dei grandi edifici come gli ospedali; la sua intrinseca resistenza alla bonifica rende inoltre impossibile la eradicazione. In secondo luogo, la legionellosi è una patologia grave che, sebbene colpisca con una bassa incidenza (16 casi/milione di persone), mostra un tasso di letalità elevato (inferiore all'8% nei casi comunitari), in particolare nei pazienti ospedalizzati (può superare il 30%). In terzo luogo, è difficile individuare una precisa correlazione tra l'entità dell'esposizione ed il rischio di sviluppare la patologia poiché sono numerosi i fattori che concorrono nel suo determinismo: la virulenza batterica, l'entità della carica microbica, le condizioni di salute dei fruitori

dell'acqua. Infine, le strategie più efficaci per la protezione dei pazienti nei confronti dei batteri idrodiffusi sono gravate da elevati costi.

Quale tra le strategie di controllo del rischio idrico sia la più auspicabile sembra ancora da definirsi con certezza; è evidente che la scelta di una o dell'altra strategia non è vincolante e quindi lo sviluppo di uno specifico *Water Safety Plan* dovrebbe essere impostato per ogni singola realtà, considerando soprattutto la possibilità di integrare il piano di gestione con varie tecniche di biologia molecolare, le cui applicazioni sono molteplici. Innanzitutto, le metodiche di tipizzazione genetica, risultano fondamentali per ricostruire la via di trasmissione e la fonte di infezione in caso di eventi epidemici; per questo obiettivo si rende necessaria la creazione di una stretta rete di collaborazione tra coloro che si occupano di sorveglianza ambientale e coloro che fanno sorveglianza clinica. Va comunque sottolineato che l'isolamento di *Legionella* spp. dal campione clinico risulta difficoltoso per motivi che vanno dalla difficoltà di reperire un campione idoneo, dal momento che è più semplice reperire un campione di urina per l'antigenuria, piuttosto che un campione da un broncolavaggio, al lungo periodo di incubazione per lo sviluppo di *Legionella* spp su terreni specifici.

In secondo luogo, la tipizzazione molecolare fornisce informazioni riguardo alla popolazione di *Legionella* spp. colonizzante la rete idrica in termini di tipologia e prevalenza di cloni ed è possibile valutare quale sia la loro distribuzione all'interno della struttura ospedaliera e seguire il loro andamento nel corso del tempo. Nel caso in cui si verificassero cluster epidemici di legionellosi nosocomiale, questo approccio non solo individuerrebbe la fonte di trasmissione, ma fornirebbe anche una valutazione più accurata del rischio indicando gli edifici dove è più probabile che si verifichi il pericolo di legionellosi.

Infine, la tipizzazione molecolare degli isolati può essere utilizzata come strumento di verifica delle procedure di bonifica intraprese, alle quali *Legionella* è spesso in grado di resistere. Sebbene alcune misure di bonifica

come l'iperclorazione shock o lo shock termico, siano risultate efficaci nel controllo della colonizzazione microbica da *Legionella* spp., il batterio appare comunque in grado di ri-colonizzare la rete. Questo fenomeno è principalmente dovuto alla capacità del batterio di parassitare almeno quattordici specie di amebe acquatiche, entro cui il microrganismo trova nutrienti e protezione dagli stress ambientali. Legionella è dotata infatti di molteplici fattori di virulenza implicati nell'invasione, nella replicazione e sopravvivenza intracellulare e nell'evasione dalle cellule ospiti. Le amebe a vita libera maggiormente parassitate da *Legionella* spp. sono quelle del genere *Acanthamoeba* e *Naegleria* che predano svariati microrganismi acquatici, tra cui Legionella; il batterio, dopo l'ingresso nel fagosoma, è capace di esprimere alcuni fattori di virulenza che favoriscono l'inibizione della formazione del fagolisosoma e che promuovono la moltiplicazione intracellulare. In questa fase, entrambi sembrano beneficiare della loro associazione dal momento che, sia Legionella che il protozoo, risultano tollerare maggiormente gli stress ambientali, compresi gli agenti disinfettanti. Tuttavia, dopo una massiccia replicazione intracellulare, il batterio esprime tratti di virulenza associati alla fase di trasmissione, che garantiscono il passaggio ad altre cellule ospiti, a discapito del protozoo che viene lisato.

La capacità di *Legionella* spp. di infettare cellule eucariotiche primitive come le amebe, sopprimendone i meccanismi difensivi e determinandone la morte, sembra aver avuto un ruolo determinante nell'abilità di infettare anche cellule eucariotiche più evolute e complesse come i macrofagi. Infatti molti geni di virulenza come il gene *mip*, il locus *lvh* e la regione *rtxA* sono implicati sia nell'infezione dei protozoi sia in quella macrofagica. Sebbene Legionella sia in grado di formare microcolonie a livello del biofilm, si comprende come i protozoi acquatici siano assolutamente fondamentali per la massiccia replicazione batterica.

Dai risultati ottenuti in questo studio è stato possibile, attraverso l'adozione di tecniche di biologia molecolare, avere ulteriori informazioni in merito alla strategia di gestione del rischio idrico adottata.

In primo luogo, i ceppi di *Legionella pneumophila* Wadsworth, che colonizzano attualmente la rete idrica, sembrano essere meno suscettibili all'azione del cloro e rispondono attivamente all'azione persistente e continua del disinfettante. I ceppi batterici isolati dopo l'inizio della clorazione infatti esprimono più marcatamente e più precocemente alcuni geni di virulenza implicati nell'infezione delle amebe e dei macrofagi, rispetto a quelli presenti nel sistema idrico prima dell'installazione dei generatori di biossido di cloro. La maggior capacità di invadere e sopravvivere all'interno delle amebe, sottraendosi all'azione del cloro, darebbe spiegazione della loro persistenza nella rete idrica. Tale capacità, è stata dimostrata nelle prove di co-coltura con *Acanthamoeba polyphaga*, verso la quale i ceppi isolati dopo l'inizio della clorazione risultano più virulenti.

In secondo luogo, la presenza nella rete idrica di ceppi batterici più virulenti potrebbe tradursi, nell'eventualità si verifici un caso di legionellosi nosocomiale, in un decorso clinico più grave e questa possibilità dovrebbe essere tenuta in considerazione nella definizione dei livelli di rischio stratificati per tipologia di paziente.

Infine, nella fase di verifica del piano di gestione, qualora gli interventi di bonifica siano in grado di indurre *Legionella* ad entrare in uno stato vitale ma non coltivabile, la sua vitalità potrebbe essere rapidamente determinata attraverso l'analisi dell'espressione dei geni di virulenza.

Concludendo, alla luce delle prove che dimostrano esserci forme di tolleranza verso il cloro da parte di *Legionella pneumophila* Wadsworth, nella pianificazione degli interventi di controllo del rischio idrico, si può ragionevolmente discutere se sia davvero utile ai fini della prevenzione e controllo della legionellosi nosocomiale, l'utilizzo, per un lungo periodo di tempo, di un solo tipo di agente disinfettante, al quale la comunità microbica potrebbe adattarsi, incrementando così il rischio di trasmissione di ceppi più virulenti.

## 9. BIBLIOGRAFIA

- Alleron Laëtitia , Nicole Merlet, Christian Lacombe and Jacques Frère Long-Term Survival of *Legionella pneumophila* in the Viable But Nonculturable State After Monochloramine Treatment *Current Microbiology* 2008;57(5):497-502
- Anaissie E.J., Costa S.F. Nosocomial aspergillosis is waterborne. *CID* 2001;33: 1546-8.
- Anassie EJ, Penzak SR, Dignani MC. The hospital water supply as a source of nosocomial infections. *Arch Intern Med* 2002;162:1483-1492.
- *Approaches to prevention and control of Legionella infection in Allegheny County Health Care Facilities.* Allegheny County Health Department, Jan 1997.
- Aurell Helena, Jerome Etienne, Françoise Forey, Monique Reyrolle, Pascale Girardo, Pierre Farge, Bénédicte Decludt, Christine Campese, François Vandenesch, and Sophie Jarraud *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Strain Paris: Endemic Distribution throughout France *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* 2003;41(7):3320–3322
- Barker J et al. Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. *Appl Environm Microbiol*, 1992;58:2420–2425.
- Best, M., Yu, V.L., Stout, J.E., et al. Legionellaceae in the hospital water supply- epidemiological link with disease and evaluation of a method of control of nosocomial legionnaires' disease and Pittsburgh pneumonia. *Lancet* 1983;2:307-310.
- Brandyopadhyay Purmina, Shuqing Liu, Carolina B. Gabbai, Zeach Venitelli, and Howard M. Steinman Environmental Mimics and the Lvh Type IVA Secretion System Contribute to Virulence-Related Phenotypes of *Legionella pneumophila* *Infection and Immunity* 2007;75(2):723-735

- Brassinga Ann Karen C., Margot F. Hiltz, Gary R. Sisson, Micheal G. Morash, Nathan Hill, Elizabeth Garduno, Paul H. Edelstein, Rafael A. Garduno and Paul S. Hoffman A 65-Kilobase Pathogenicity Island Is Unique to Philadelphia-1 Strains Of *Legionella pneumophila* *Journal of Bacteriology* 2003;185(15):4630-4637
- Byrne Brenda and Michele S. Swanson Expression of *Legionella pneumophila* Virulence Traits in Response to Growth Conditions *Infect Immun* 1998;66(7):3029-3034
- Cachafeiro Is copperesilver ionisation safe and effective in controlling legionella? *Journal of Hospital Infection* 2007;67:209-216
- Chang CW, Kao CH and Liu YF Heterogeneity in chlorine susceptibility for *Legionella pneumophila* released from *Acanthamoeba* and *Hartmannella* *Journal of Applied Microbiology* 2008 doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03980.x
- Chen et al. Legionella Effectors That Promote Nonlytic Release from Protozoa *Science* 2004; 303 no. 5662:1358 – 1361
- CIANCIOTTO NICHOLAS P. AND BARRY S. FIELDS *Legionella pneumophila* mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages *Proc. Nati. Acad. Sci. Microbiology* 1992;89:5188-5191
- Cirillo Suat L. G., Jeremy Lum and Jeffrey D. Cirillo Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila* *Microbiology* 2000;146:1345–1359
- Cirillo Suat L. G., Ling Yan, Michael Littman, Mustapha M. Samrakandi and Jeffrey D. Cirillo Role of the *Legionella pneumophila* *rtxA* gene in amoebae *Microbiology* 2002;148:1667-1677
- Cirillo Suat L. G., Luiz E. Bermudez, Sahar H. El-Etr, Gerald E. Duhamel and Jeffrey D. Cirillo *Legionella pneumophila* Entry Gene *rtxA* Is Involved in Virulence *Infection and Immunity* 2001,63(1):508-517
- Conferenza permanente per i rapporti tra lo stato, le regioni e le provincie autonome di Trento e Bolzano. “Documento di linee-guida per

la prevenzione e il controllo della legionellosi". Gazzetta Ufficiale Numero 103 (Serie Generale) del 5 Maggio 2000.

- Darelid J, Löfgren S, Malmvall BE. Control of nosocomial Legionnaires' disease by keeping the circulating hot water temperature above 55°C: experience from a 10-year surveillance programme in a district general hospital. *Journ Hosp Inf* 2002; 50:213-219.
- De Zoysa AS, Harrison TG. Molecular typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 by pulsed-field gel electrophoresis with SfiI and comparison of this method with restriction fragment-length polymorphism analysis. *J Med Microbiol* 1999; 48: 269-278.
- Declerck Priscilla Biofilms: the environmental playground of *Legionella pneumophila* *Environmental Microbiology* 2009 doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02025.x
- Ditommaso S, Biasin C, Giacomuzzi M, Zotti CM, Ruggenini A, Moiraghi A. Prevenzione della legionellosi: confronto tra linee guida europee ed extraeuropee. *Giornale Italiano delle Infezioni Ospedaliere* 2003;10(1):7-24.
- 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.
- Doléans-Jordheim Anne, Mongi Akermi, Christophe Ginevra, Christel Cazalet, Elizabeth Kay, Dominique Schneider, Carmen Buchrieser, Danièle Atlan, François Vandenesch, Jerome Etienne and Sophie Jarraud Growth-phase dependent mobility of the *lvh*-encoding region in *Legionella pneumophila* strain Paris *Microbiology* 2006;152:3561-3568
- Donlan and Costerton Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002;8:881–890.
- Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002;8:881-890.
- Engleberg NC, Carter C, Weber DR, Cianciotto NP, Eisenstein BI. DNA sequence of mip, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infect Immun.* 1989;57(4):1263-70.

- EWGLI [www.ewgli.org](http://www.ewgli.org)
- Exner M. et al. Prevention and control of health care-associated waterborne infections in health care facilities. *Am J Infect Control* 2005;33:S26-40.
- 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(4):301-307
- Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaire's disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews*, 2002;15(3):506-526.
- Freije MR. Formulating a risk reduction strategy for waterborne pathogens in hospital water system. *Am J Infect Control* 2005;33:S50-53.
- Gaia et al. Consensus Sequence-Based Scheme for Epidemiological Typing of Clinical and Environmental Isolates of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* May 2005; 2047-2052.
- Gao Lian-Yong and Yousef Abu Kwaik The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila* *Environmental Microbiology* 2000;2(1):79±90
- García MT, Baladro B, Gil V, Tarancon ML, Vilasau A, Ibañez A, Elola C and Pelaz C Persistence of chlorine-sensitive *Legionella pneumophila* in hyperchlorinated installations *Journal of Applied Microbiology* 2008 doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03804.x
- Garcia MT. et al. *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environmental Microbiology* 2007 9(5),1267-1277.
- Garcia-Nuñez Marian, Nieves Sopena1, Sonia Ragull, Maria Luisa Pedro-Botet, Josep Morera, Miguel Sabria Persistence

of Legionella in hospital water supplies and nosocomial Legionnaires' disease DOI:10.1111/j.1574-695X.2007.00362.x 2007

- Georg Daeschlein, William H Krüger, Christian Selepko, Markus Rochow, Gottfried Dölken and Axel Kramer Hygienic safety of reusable tap water filters (Germlyser®) with an operating time of 4 or 8 weeks in a haematological oncology transplantation unit *BMC Infectious Diseases* 2007;7:45
- Guidelines for Preventing Health-Care-Associated Pneumonia, 2003. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee - March 26, 2004 / Vol 53 / No. RR-3 - USA
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:95-108
- Hamilton E, Seal DV, Hay J. Comparison of chlorine and chlorine dioxide disinfection for control of *Legionella* in a hospital potable water supply. *Journ Hosp Inf* 1996;32:156-160
- Harb Omar S., Lian-Young Gao and Yousef Abu Kwak From protozoa to mammalian cells: a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens *Environmental Microbiology* 2000;2(3):251-265
- Harrison et al. Principles of Internal Medicine, 15 th Edition McGraw-Hill.
- Hawn et al. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med* 2003;198:1563-72.
- Hindré Thomas, Holger Bruggemann, Carmen Buchrieser and Yann Hechard Transcriptional profiling of *Legionella pneumophila* biofilm cells and the influence of iron on biofilm formation *Microbiology* 2008;154:30–41
- Hosein IK et al. Point-of-care controls for nosocomial legionellosis combined with chlorine dioxide potable water

decontamination: a two-year survey at a Welsh teaching hospital. *Journal Hosp Inf* 2005;61:100-106.

- Huang Bixing, Zheng Yuan, Brett A. Heron, Bruce R. Gray, Sofroni Eglezos, John R. Bates and John Savill1 Distribution of 19 major virulence genes in *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from patients and water in Queensland, Australia *Journal of Medical Microbiology* 2006;55:993–997
- ISO 11731:1998 Water quality, Detection and enumeration of *Legionella*
- 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 BR et al. Literature review – efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water research* 2002;36 4433-4444.
- Kirby James E., Joseph P. Vogel, Helene L. Andrews, and Ralph R. Isberg, Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila* *Molecular Microbiology* 1998;27(2):323–336
- Kutcha JM et al. Susceptibility of *Legionella pneumophila* to Chlorine in Tap Water. *Appl Env Microbiol* 1983; 11:1134-1139.
- Lettinga KD, Weijer S, Speelman P, Prins JM, Van Der Poll T, Verbon A, Reduced interferon-gamma release in patients recovered from Legionnaires' disease. *Thorax* 2003 Jan; 58: 63-7
- Lindsay D., Von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hosp Inf* 2006;64:313-325
- Lindsay D., Von Holy A. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hosp Inf* 2006;64:313-325
- Livak Kenneth J. and Thomas D. Schmittgen Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method *METHODS* 2001;25:402–408

- Macfarlane JT et al. Prospective study of aetiology and outcome of adult lowerrespiratory-tract infections in the community. *Lancet* 1993; 341(8844):511–514.
- Molmeret Maelle, Marina Santic, Rexford Asare, Reynold A. Carabeo, and Yousef Abu Kwaik Rapid Escape of the *dot/icm* Mutants of *Legionella pneumophila* into the Cytosol of Mammalian and Protozoan Cells *INFECTION AND IMMUNITY* 2007;75(7):3290–3304
- Molmeret Maelle, Matthias Horn, Michael Wagner, Marina Santic, and Yousef Abu Kwaik Amoebae as Training Grounds for Intracellular Bacterial Pathogens *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 2005:20–28
- Molmeret Maelle, O. A. Terry Alli, Steven Zink, Antje Flieger, Nicholas P. Cianciotto, and Yousef Abu Kwaik *icmT* Is Essential for Pore Formation-Mediated Egress of *Legionella pneumophila* from Mammalian and Protozoan Cells *INFECTION AND IMMUNITY* 2002;70(1):69–78
- Molofsky Ari B. and Michele S. Swanson Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle *Molecular Microbiology* 2004;53(1):29–40
- 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
- Oliver James D. The viable but Nonculturable State in Bacteria *The Journal of Microbiology* 2005;43:93-100
- 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; Volume 33: Issue 5 Supplement 1, S1-S19.

- Parsek MR, Fuqua C. Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *J bacteriol* 2004;186:4427-4440.
- Parsek MR, Fuqua C. Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *J bacteriol* 2004;186:4427-4440.
- Rangel-Frausto M, Sigfrido, Paul Rhomberg, Richard J. Hollis, Michael A. Pfaller, Richard P. Wenzel, Charles M. Helms, Loreen A. Herwaldt PERSISTENCE OF *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* IN A HOSPITAL'S WATER SYSTEM: A 13-YEAR SURVEY *INFECTION CONTROL AND HOSPITAL EPIDEMIOLOGY* 1999;20(12):793-1999
- Ridenour Dennis A., Suat L. G. Cirillo, Sheng Feng, Mustapha M. Samrakandi and Jeffrey D. Cirillo Identification of a Gene That Affects the Efficiency of Host Cell Infection by *Legionella pneumophila* in a Temperature-Dependent Fashion *INFECTION AND IMMUNITY*. 2003;71(11):6256–6263
- Ridgeway HF, Olson BH. Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 1982;44:972-987.
- Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW. Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:1842-1851.
- Rota MC, Caporali MG, Losardo M, Scaturro M, Ricci ML. “La Legionellosi in Italia nel 2008: rapporto annuale” *Not Ist Super Sanità* 2009;22(9):14-19
- Rowbotham Timothy J Isolation of legionella pneumophila from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae *J Clin Pathology* 1983;36:978-986
- Salvatorelli et al. Effectiveness of installing an antibacterial filter at water taps to prevent Legionella infections. *J Hosp Infect.* 2005;61(3):270-1.

- Sambrook et al. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- Segal Gil, James J. Russo and Howard A. Shuman Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila* *Molecular Microbiology* 1999;34(4):799±809
- Segal Gil, Michal Feldman, Tal Zusman The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii* *FEMS Microbiology Reviews* 2005;29:65–81
- Sheehan KB, Henson JM, Ferris MJ. *Legionella* species diversity in an acidic biofilm community in Yellowstone National Park. *Appl Environ Microbiol*, 2005;71:507–511.
- Sheffer et al. Efficacy of new point-of-use water filter for preventing exposure to *Legionella* and waterborne bacteria. *Am J Infect Control* 2005;33:S20-5
- Spörri R, Joller N, Albers U, Hilbi H, Oxenius A. MyD88-dependent IFN-gamma production by NK cells is key for control of *Legionella pneumophila*. *Infection J Immunol* 2006;176(10):6162-71.
- Srinivasan A et al. A 17-month evaluation of a chlorine dioxide water treatment system to control *Legionella* species in hospital water supply. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003;24:575-579.
- Steinert M, Emody L, Amann R, et al. Resuscitation of Viable but Nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology* 1997;63(5):2047–2053.
- Stout JE, Yu VL . Legionellosis. *New England Journal of Medicine* 1997; 337:682–687.
- Tenover FC et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-2239.
- Toze Simon , Lindsay I. Sly, Ian C. MacRae and John A. Fuerst Inhibition of growth of *Legionella* species by heterotrophic plate count

bacteria isolated from chlorinated drinking water *Current Microbiology* 1990;21:139-143

- Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 2000;182:2675-2679.
- Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 2000;182:2675-2679.
- WINTERMEYER EVA, BIRGIT LUDWIG, MICHAEL STEINERT, BETTINA SCHMIDT, GUNTER FISCHER, AND JORG HACKER Influence of Site Specifically Altered Mip Proteins on Intracellular Survival of *Legionella pneumophila* in Eukaryotic Cells *INFECTION AND IMMUNITY*. 1995:4576–4583
- World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. Geneva: World Health Organization; 2004.
- World Health Organization. *Legionella* and the prevention of legionellosis. 2007
- Xu Li, Xihui Shen, Andrew Bryan, Simran Banga, Michele S. Swanson, Zhao-Qing Luo Inhibition of Host Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase Activity by a *Legionella pneumophila* Effector *PLoS Pathog.* doi:10.1371/journal.ppat.1000822
- Yu VL. *Legionella pneumophila* (Legionnaires' disease). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and practice of infectious diseases, 2000*; Philadelphia, Churchill Livingstone, 2424–2435.
- Zhang Z et al. Safety and efficacy of chlorine dioxide for *Legionella* control in a hospital water system. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007 Aug;28(8):1009-12.