



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea Magistrale**

**BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA**

---

**Sviluppo di un metodo microbiologico per la  
determinazione di *Legionella pneumophila* in  
campioni di acque destinate al consumo umano**

**Development of a microbiological method for the  
determination of *Legionella pneumophila* in water  
samples intended for human consumption**

Tesi di Laurea Magistrale  
di:  
**Giulia Cartone**

---

Relatore  
Chiar.mo Prof.  
**Maurizio Ciani**

---

## Sommario

1. INTRODUZIONE .....	3
2. SCOPO DEL LAVORO .....	3
2.1. <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i> .....	5
2.1.1. CARATTERISTICHE MICROBIOLOGICHE .....	9
2.1.2. CONDIZIONI IDEALI PER LO SVILUPPO DELLA <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i> .....	12
2.1.3. MODALITÀ DI TRASMISSIONE E PATOGENESI .....	13
2.2. ACQUA DESTINATA AL CONSUMO UMANO .....	16
2.3. LA SORVEGLIANZA IN AMBIENTE OSPEDALIERO .....	21
2.4. VALUTAZIONE DEL RISCHIO ED IMPOSTAZIONE DI UN PIANO DI GESTIONE DEL RISCHIO IDRICO .....	23
3. MATERIALI E METODI .....	29
3.1. SCOPO .....	30
3.2. PRINCIPIO .....	30
3.3. PROCEDURA .....	31
3.3.1. CAMPIONI .....	31
3.4. PRETRATTAMENTO DEL CAMPIONE .....	32
3.4.1. TRATTAMENTO TERMICO .....	32
3.4.2. TRATTAMENTO ACIDO .....	32
3.5. COLTURE .....	33
3.6. INCUBAZIONE .....	35
3.7. ESAME DELLE PIASTRE .....	36
3.8. CONFERMA DELLE PRESUNTE COLONIE DI <i>LEGIONELLA PNEUMOPHILA</i> SU AGAR BCYE E AGAR BCYE-CYS .....	37

3.9. ESPRESSIONE DEI RISULTATI .....	38
3.10. ASSICURAZIONE QUALITÀ .....	39
4. RISULTATI E DISCUSSIONE .....	40
5. CONCLUSIONE .....	46
6. BIBLIOGRAFIA .....	49

## **1. INTRODUZIONE**

Le infezioni sostenute da *Legionella pneumophila* rappresentano oggi un problema di sanità pubblica per la frequente presenza del microrganismo nell'acqua calda sanitaria e nell'umidificazione degli impianti aeraulici di case, alberghi, campeggi, centri sportivi, ospedali, case di riposo, ecc., oltre che nelle torri di raffreddamento degli impianti di condizionamento di grandi edifici e in ogni situazione in cui l'acqua ristagna a temperatura di almeno 25°C.

Tali infezioni rappresentano infatti una delle nuove emergenze nel campo delle malattie infettive. A tutt'oggi le malattie idrodiffuse (waterborne disease, WBD) permangono fra le principali cause di morbosità e mortalità in tutto il mondo. (Declerck et al.2007; Fliermans et al.1981).

## **2. SCOPO DEL LAVORO**

Questo lavoro di tesi è incentrato sullo sviluppo di un metodo analitico per la determinazione di *Legionella pneumophila* in campioni di acque destinati al consumo umano.

In questo lavoro di tesi sono stati valutati i metodi di coltura per l'isolamento della *Legionella pneumophila* e la stima del loro numero nei campioni di acqua.

Questi metodi sono applicabili a tutti i tipi di campioni d'acqua, comprese le acque potabili, industriali, di scarico e naturali. Questi metodi possono essere utilizzati per matrici legate all'acqua, ad es. biofilm, sedimenti, ecc.

Non tutte le *Legionella pneumophila* sono coltivabili quindi, i metodi qui descritti non permettono di coltivare tutte le specie di *Legionella pneumophila*.

Sono stati eseguiti successivamente dei trattamenti correttivi sull'impianto delle strutture sanitarie che consistono in:

- Shock termico: consiste nell'elevare la temperatura dell'acqua a 70-80°C per tre giorni consecutivi raccomandando lo svuotamento preventivo dei serbatoi di acqua calda, la loro pulizia e la successiva decontaminazione con 100 mg/L di cloro per 12-14 ore e assicurando il suo deflusso da tutti i punti di erogazione per almeno 30 min al giorno.
- Iperclorazione shock: viene praticata, dopo aver disattivato il riscaldamento del boiler ed atteso il raffreddamento dell'impianto a temperature non superiori a 30°C, sull'acqua fredda di reintegro effettuando una singola immissione di disinfettante (ipoclorito di sodio o di calcio) fino ad ottenere concentrazioni di cloro residuo libero di 20 mg/L in tutta la rete, ivi compresi i punti distali. Dopo un periodo di contatto di 2 h per 20 mg/L di cloro, l'acqua presente nel sistema di distribuzione viene drenata e sostituita con una nuova immissione di acqua fredda in quantità tale da ridurre la concentrazione di cloro residuo entro l'intervallo di 0,5-1,0 mg/L presso i punti distali dell'impianto.
- Combinazione dei due trattamenti in modo tale da ridurre la concentrazione di cloro che potrebbe rendere l'acqua non potabile e danneggiare alcuni tipi di tubature.

## **2.1. LEGIONELLA PNEUMOPHILA**

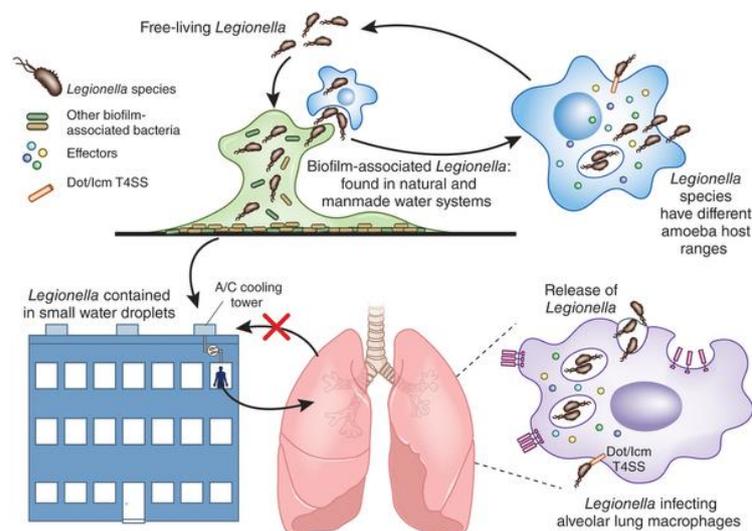
Le *Legionelle* sono presenti negli ambienti acquatici naturali e artificiali: si riscontrano nelle sorgenti, comprese quelle termali, nei fiumi, laghi, vapori, terreni. Da questi ambienti esse raggiungono quelli artificiali come condotte cittadine e impianti idrici degli edifici, quali serbatoi, tubature, fontane e piscine (sono state rilevate anche in fanghi di fiume o torrente, o argilla per manufatti in terracotta), ma anche plastica, gomma, legno e sedimenti organici. (Bates M. N., Maas E., 2000)

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

Nonostante le conoscenze su questo batterio si siano ampiamente sviluppate dal 1976, anno della prima identificazione, ad oggi, i casi di "legionellosi" rimangono comuni in Italia come nel resto del mondo e questo continua a suscitare un crescente interesse fra gli addetti ai lavori, ma anche nella popolazione generale. Si è osservato un po' ovunque nei Paesi industrializzati un notevole incremento del numero di casi e questo può essere attribuito sia al miglioramento degli strumenti diagnostici disponibili e alla maggiore sensibilità dei clinici nei confronti della malattia, sia ai mutati stili di vita della popolazione che tendono ad aumentare le occasioni di esposizione all'agente eziologico (incremento del turismo, della frequentazione di centri-

benessere etc.) e alla sempre più diffusa installazione di impianti di condizionamento centralizzati negli ambienti ad uso collettivo, dotati di torri di raffreddamento e/o condensatori evaporativi.

Essendo il microrganismo ubiquitario, la malattia può manifestarsi con epidemie dovute ad un'unica fonte con limitata esposizione nel tempo e nello spazio all'agente eziologico, oppure con una serie di casi indipendenti in un'area ad alta endemia o con casi sporadici senza un evidente raggruppamento temporale o geografico. Focolai epidemici si sono ripetutamente verificati in ambienti collettivi a residenza temporanea, come ospedali o alberghi, navi da crociera, esposizioni commerciali, ecc. I casi di polmonite da *Legionella pneumophila* di origine comunitaria si manifestano prevalentemente nei mesi estivo-autunnali, mentre quelli di origine nosocomiale non presentano una particolare stagionalità. (Borella P., Montagna M.T., 2004)



**Figura 1: trasmissione di *Legionella pneumophila***

"Legionellosi" è la definizione di tutte le forme morbose causate da batteri gram-negativi aerobi del genere *Legionella pneumophila*. Essa si può

manifestare sia in forma di polmonite con tasso di mortalità variabile tra 10-15%, sia in forma febbrile extrapolmonare o in forma subclinica. La specie più frequentemente coinvolta in casi umani è *L. pneumophila*, il cui nome significa letteralmente “*Legionella pneumophila* amante dei polmoni”. Questo termine fu coniato a seguito di un raduno di circa 4400 ex combattenti del Vietnam (legionnaires) tenutosi presso un hotel di Philadelphia nel luglio del 1976.

Nel corso di questo evento circa 220 partecipanti si ammalarono di una grave forma di infezione polmonare ancora sconosciuta e 34 di questi morirono dopo pochi giorni. (Brabender et al.1983;Lowry et al. 1991; Lowry and Tompkins, 1993)

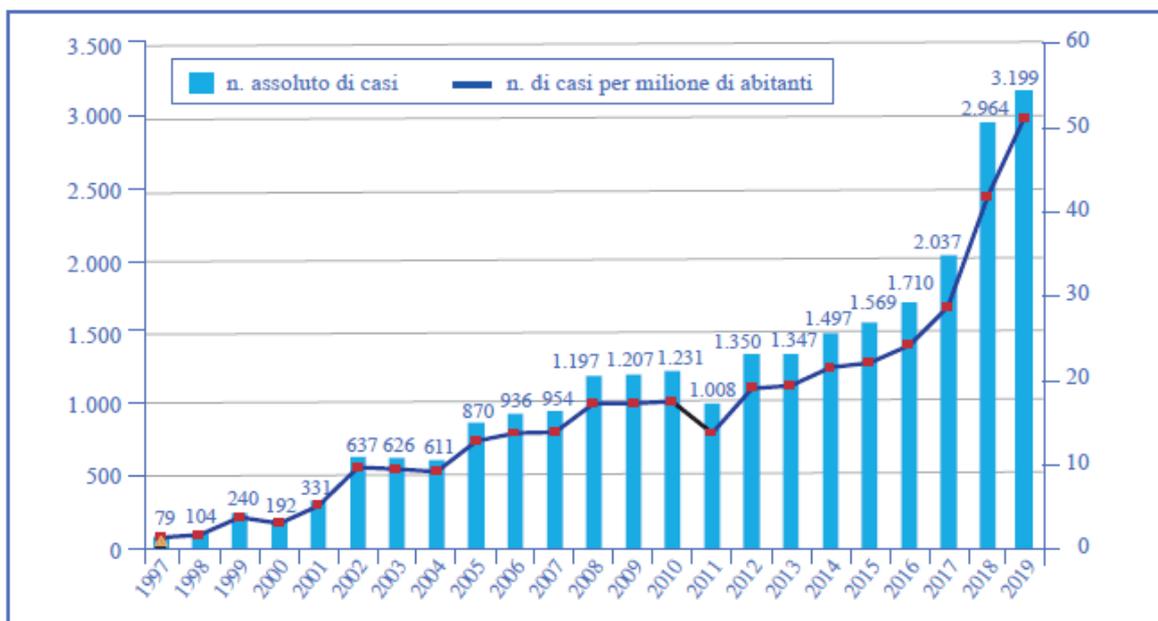
Gli accertamenti medici che ne seguirono, stabilirono che le infezioni polmonari erano imputabili alla proliferazione di batteri di origine ignota.

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

Tale scoperta fu l’inizio di un percorso “a ritroso” nel tempo alla ricerca di casi simili avvenuti a seguito di epidemie di origine sconosciuta. Il caso più datato risale al 1947 ed è riferito alla morte di un soldato avvenuta nello Stato della North Carolina per una polmonite non identificata.

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

L’incidenza della legionellosi in Italia è cresciuta negli anni e nel 2019 è risultata pari a 52,9 casi per milione di abitanti, con un lieve aumento rispetto all’anno precedente (48,9/1.000.000) (Figura 2). Tuttavia, si osserva un gradiente Nord-Sud con valori pari a 80,8 casi per milione al Nord, 54,4 al Centro e 14,7 al Sud.



**Figura 2: numeri di casi e tasso di incidenza della legionellosi in Italia dal 1997 al 2019**

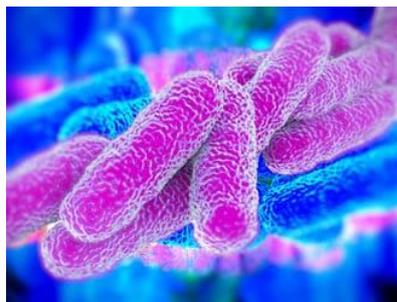
L’età media dei pazienti è di 66,5 anni (deviazione standard: 14,8 anni), con un intervallo compreso tra 0 e 101 anni. Il 67% dei casi ha almeno 60 anni, 69,5% è di sesso maschile e il rapporto maschi/femmine è di 2,3:1.

Età	Maschi		Femmine		Totale	
	n. casi	Tasso (n./milione)	n. casi	Tasso (n./milione)	n. casi	Tasso (n./milione)
0-19	1	0,2	0	0,0	1	0,1
20-29	22	6,8	6	2,0	28	4,5
30-39	86	24,2	14	4,0	100	14,1
40-49	225	49,0	52	11,2	277	30,0
50-59	461	100,7	130	27,2	591	63,2
60-69	523	149,0	231	60,4	754	102,8
70-79	518	190,0	231	71,4	749	125,6
80+	384	239,2	312	114,5	696	160,7
Non noto					3	
<b>Totale</b>	<b>2.220</b>	<b>75,5</b>	<b>976</b>	<b>31,5</b>	<b>3.199</b>	<b>52,9</b>

*Tabella 1: numero di casi e tasso di incidenza per fascia d'età e sesso*

### 2.1.1. CARATTERISTICHE MICROBIOLOGICHE

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



*Figura 3: Legionella pneumophila*

*Legionella pneumophila* è la specie più frequentemente rilevata nei casi diagnosticati (Frazer et al.1977; De Dade et al.1979) ed è costituita da 16 sierogruppi di cui *Legionella pneumophila* sierogruppo 1, responsabile dell'epidemia verificatasi a Philadelphia (USA) nel 1976, è causa del 95%

delle infezioni in Europa e dell'85% nel mondo, seguita da *L. longbeachae* (3,9%) e *L. bozemanai* (2,4%), mentre altre specie, meno frequentemente isolate in campioni clinici, sono *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. feeleii*, *L. wadsworthii* e *L. anisa* (2,2% in totale).

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

*Legionella pneumophila* è un bacillo Gram-negativo, aerobio, asporigeno, mobile per la presenza di uno o più flagelli ed ha dimensioni che vanno da 0,3 a 0,9 µm di larghezza, da 1,5 a 5 µm di lunghezza, mentre in coltura è presente con forme filamentose lunghe fino a 20 µm. 30.(Edelstein, 1993)

La parete cellulare della Legionelle è atipica per la presenza di acidi grassi a catena ramificata, mentre, sotto l'aspetto biochimico questo batterio non mostra alcuna attività fermentativa dei carboidrati ma ha una debole attività ossidasica e catalasica e una buona attività proteolitica. La fonte di energia per il mantenimento dello stato vitale della *Legionella pneumophila* è presente in alcuni amminoacidi come cisteina, arginina, isoleucina, metionina e la sua crescita è stimolata da composti del ferro. È da tener presente l'attività di autofluorescenza di alcune specie di *Legionella pneumophila*, ad esempio *L. bozemanai* e *L. gormanii* mostrano una fluorescenza blu-bianca se illuminate

da luce UV. *L. pneumophila* e *L. micdadei* non sono fluorescenti. (Casini B, Valentini P, 2008)

Le legionelle sono ampiamente diffuse in natura, in particolar modo risultano essere associate alla presenza di acqua (superfici lacustri e fluviali, sorgenti termali, falde idriche ed ambienti umidi in genere). Esse prediligono gli habitat acquatici caldi: si riproducono tra 25 e 42°C, ma sono in grado di sopravvivere per diverse ore a 50°C mentre a 70° C, quando non si trova in simbiosi con alcuni microrganismi, esso viene distrutto in modo istantaneo. Questi batteri presentano anche una buona sopravvivenza in ambienti acidi e alcalini, sopportando valori di pH compresi tra 5,5 e 8,1. La facilità con cui *Legionella pneumophila* si riproduce nell'ambiente naturale è in contrasto con la difficoltà a crescere sui terreni di coltura artificiali dal momento che le legionelle per poter essere isolate in laboratorio necessitano di terreni di crescita molto selettivi, spesso caratterizzati da antibiotici in modo da poter favorire solo l'isolamento di *Legionella pneumophila*. (Casini B, Buzzigoli A, 2014)

Il paradosso esistente tra l'ubiquitarietà delle legionelle in ambiente naturale e la difficoltà di crescita in un contesto artificiale può essere spiegato dalla capacità di questi batteri di entrare e moltiplicarsi all'interno di protozoi ciliati ed amebe, i quali costituiscono una fonte di nutrimento e di protezione dalle condizioni ambientali sfavorevoli grazie anche alla capacità delle amebe di produrre forme di resistenza come le cisti.

L'infezione all'interno di protozoi permette ai batteri di acquisire una spiccata virulenza. Occorre anche tener conto della capacità delle legionelle di formare biofilms, infatti, negli impianti idrici è possibile trovare la presenza di legionelle sia in forma libera che in forma ancorata al biofilm, il quale viene definito come una comunità microbica costituita da microrganismi (batteri,

protozoi, virus, miceti etc.) adesi irreversibilmente ad un substrato e immersi in una matrice esopolisaccaridica prodotta da essi stessi. I biofilm costituiscono un terreno fertile per molti germi patogeni come *E. coli* o *Legionella pneumophila*, proteggendoli da influenze chimico-fisiche. I microrganismi presenti nei biofilm sono estremamente resistenti ai disinfettanti. (Cristino S, Legnani PP, 2012)

Si può supporre che anche i batteri acquatici possano influenzare positivamente o negativamente la sopravvivenza di *Legionella pneumophila*. (Garcia M.T., Jones S, 2007) Molti batteri, ad esempio, possono esprimere una attività inibente nei confronti di *Legionella pneumophila* grazie alla possibilità di produrre batteriocine o Bacteriocin-Like Substances (BLS), molecole di natura proteica dotate di potere inibente nei confronti di microrganismi appartenenti alla stessa specie o strettamente correlata.

### **2.1.2. CONDIZIONI IDEALI PER LO SVILUPPO DELLA *LEGIONELLA PNEUMOPHILA***

La sola presenza di *Legionella pneumophila* negli acquedotti non costituisce pericolo per le persone. I batteri diventano pericolosi solo quando sussistono contemporaneamente le seguenti condizioni: (Rogers J, Dowsett AB, 1994)

1. Temperatura ottimale di sviluppo varia da 25°C a 42°C. La crescita dei batteri è massima a circa 37°C.
2. Presenza di ambiente aerobico
3. Presenza di elementi nutritivi, biofilm, scorie, ioni di ferro e di calcio, altri microrganismi
4. Nebulizzazione dell'acqua con formazione di microgocce aventi diametri variabili da 1 a 5 micron

5. Alto livello di contaminazione, generalmente si ritiene che tale livello
6. debba superare i 1000 CFU/L.

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

Fattori chimici che possono condizionare lo sviluppo di *Legionella pneumophila* sono riferibili agli ioni d'Argento ( $Ag^{++}$ ) e Rame ( $Cu^{++}$ ) che risultano inibitori, quindi, secondo alcuni autori, le tubature in rame inibiscono la colonizzazione. Per contro, i siliconi, il teflon, favoriscono l'adesione e il caucciù (giunti e ranelle) favoriscono uno sviluppo intenso. In genere, tutti i materiali che rilasciano in un ambiente liquido delle particelle organiche utilizzabili dai microorganismi favoriscono la colonizzazione da parte della *Legionella pneumophila* (si pensi ai diversi tipi di plastiche). (Conferenza Stato-Regioni, 2000)

### **2.1.3. MODALITÀ DI TRASMISSIONE E PATOGENESI**

La malattia del legionario è entrata nel nostro lessico quando ha colpito 221 persone, per lo più legionari americani, e ha causato 34 vittime a Filadelfia nel luglio 1976. (Diederer, B.M.W. 2008)

Da allora, abbiamo appreso che la malattia è stata recentemente riconosciuta e che si verifica in tutto il mondo in forme epidemiche ed endemiche. Apparentemente è una delle principali cause di polmonite e responsabile di una parte sostanziale delle polmoniti nosocomiali fatali.

Colpisce tutti i gruppi di età, ma in particolare le persone con più di 30 anni e gli uomini più spesso delle donne. Il tasso di mortalità è stato compreso tra il 15 e il 20%.

La legionellosi viene normalmente acquisita per via respiratoria mediante inalazione, aspirazione o microaspirazione di aerosol contenente *Legionella pneumophila*, oppure di particelle derivate per essiccamento. (Griffiths, J., . 2008.). Le goccioline si possono formare sia spruzzando l'acqua che facendo gorgogliare aria in essa, o per impatto su superfici solide. La pericolosità di queste particelle di acqua è inversamente proporzionale alla loro dimensione. Gocce di diametro inferiore a 5 $\mu$  arrivano più facilmente alle basse vie respiratorie.

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

**Tabella 2: Principali modalità e sorgenti di trasmissione della Legionella**

Sono stati inoltre segnalati in letteratura casi di legionellosi acquisita attraverso ferita. Non è mai stata dimostrata la trasmissione interumana della malattia. Una volta penetrati nell'organismo, i batteri raggiungono i polmoni dove vengono fagocitati dai macrofagi alveolari, che però non sono in grado di uccidere o inibire la crescita; le legionelle riescono, infatti, ad eludere i meccanismi microbicidi dei fagociti e si moltiplicano all'interno di questi fino a provocarne la lisi, con conseguente rilascio di una progenie batterica che può

infettare altre cellule. Alla base della patogenesi dell'infezione vi è quindi la capacità delle legionelle di moltiplicarsi all'interno dei macrofagi. Penetrano in queste cellule per fagocitosi e una volta all'interno sono incorporate in un vacuolo "specializzato" che non viene attaccato dagli enzimi dei macrofagi alveolari deputati alla eliminazione degli agenti patogeni. Pur non essendoci riscontri scientifici precisi, si ritiene comunemente che le concentrazioni di *Legionella pneumophila* comprese tra 10<sup>2</sup> e 10<sup>4</sup> ucf siano idonee a provocare un caso di infezione l'anno, mentre cariche comprese tra 10<sup>4</sup> e 10<sup>6</sup> ucf possono provocare casi sporadici.

Mentre la maggior parte dei primi casi di legionellosi sono stati attribuiti a particelle di acqua aerodisperse, contenenti batteri provenienti da torri di raffreddamento o condensatori evaporativi o sezioni di umidificazione delle unità di trattamento dell'aria, le infezioni più recenti sono risultate causate anche dalla contaminazione di impianti di acqua potabile, apparecchi sanitari, fontane e umidificatori ultrasonici. (Carraro, E., Bonetta, S., 2004)

Eventi epidemici verificatisi in vari Paesi, che hanno riguardato frequentatori di fiere ed esposizioni nelle quali si sono create condizioni di rischio di infezione da sistemi generanti aerosol (piscine e vasche da idromassaggi, esposte a fini dimostrativi, e fontane decorative), suggeriscono l'opportunità di considerare anche queste manifestazioni nell'anamnesi dei casi e nell'indagine epidemiologica. (Conferenza Stato-Regioni, 2005)

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

## **2.2. ACQUA DESTINATA AL CONSUMO UMANO**

L'acqua è un bene primario per la vita e una risorsa rinnovabile del nostro pianeta. Ogni forma di vita è legata all'acqua e ogni attività umana è vincolata alla possibilità di accedervi. Negli anni si è assistito ad un continuo aumento del consumo idrico mondiale che è in costante crescita a causa dell'aumentato uso civile, industriale e agricolo.

Per quanto riguarda l'uso civile dell'acqua, è necessaria una distinzione, in base al tipo d'impegno, in acqua potabile e in acqua a uso non potabile.

L'acqua potabile è acqua che dopo essere stata trattata o lasciata naturale, è destinata ad essere bevuta (alimento) o utilizzata per preparare cibi e per pulire utensili e attrezzature che entrano in contatto con derrate alimentari, e pertanto deve essere idonea al consumo dal punto di vista microbiologico, chimico e fisico. Per acque ad uso non potabile, invece, si intendono principalmente le acque ad uso ricreativo, la cui popolarità è aumentata in tutto il mondo per le tante attività ad esse legate; questa tipologia di acque include acque di piscine (fra cui, vasche calde e stazioni termali), di fontane nonché acque marine o dolci (laghi, fiumi, torrenti).

In Italia le acque destinate al consumo umano sono definite dal D.Lgs. 31/2001 nei seguenti modi:

“Le acque, trattate o non trattate, destinate ad uso potabile, alla preparazione di cibi e bevande, o ad altri usi domestici, a prescindere dalla loro origine, siano esse fornite tramite una rete di distribuzione, mediante cisterne, in bottiglie o in contenitori”; “Le acque utilizzate in un'impresa alimentare per la fabbricazione, il trattamento, la conservazione o l'immissione sul mercato di prodotti o di sostanze destinate al consumo umano”.

L'Articolo 3 del Decreto va ad escludere dalle acque destinate al consumo umano le acque minerali e medicinali riconosciute, nonché quelle acque che non hanno ripercussioni sulla salute umana.

Al fine di perseguire finalità preventive, il Decreto promuove la tutela della salute pubblica delle acque attraverso vari obblighi descritti nei suoi vari articoli in modo tale da ottenere salubrità e pulizia delle acque e soprattutto l'assenza di microrganismi in quantità che possano creare danno all'uomo.

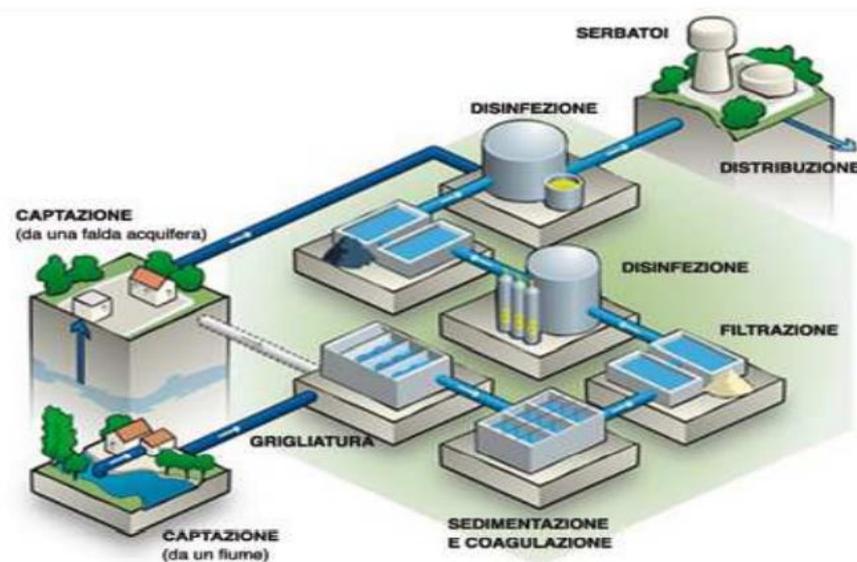
L'acqua destinata al consumo umano ha origini sotterranee o profonde, superficiali come fiumi, laghi, salmastre se opportunamente trattate. In ogni caso è necessario ricorrere a cicli di trattamenti di potabilizzazione, per migliorarne la qualità visto che le stesse sono meno igieniche e più sporche. La depurazione si effettua facendo passare la acque grezze attraverso diversi tipi di impianti i quali hanno il compito di rimuovere materiale inorganico ed organico. Tali sostanze possono essere di origine naturale, come ferro e manganese (specialmente presenti in acque profonde), idrogeno solforato (presente in acque di falda o in aree vulcaniche), e i solfati (presenti soprattutto nelle acque profonde ed in zone ad attività termale); di origine antropica, come metalli pesanti (antimonio, arsenico, piombo originati dagli scarichi industriali), microinquinanti organici (idrocarburi, pesticidi e solventi), ammoniaca, nitriti, nitrati. I processi di potabilizzazione devono essere progettati per garantire all'acqua trattata idonee caratteristiche organolettiche, fisiche, chimicobiologiche.

I diversi metodi usati possono essere classificati in:

- Trattamenti fisici semplici, svolti in unica fase in cui si eliminano i solidi sospesi sedimentabili e grossolani non sedimentabili tramite

grigliatura e sedimentazione, e i solidi non sedimentabili tramite staccatura e filtrazione;

- Trattamenti fisici e chimici, svolti in più fasi e volti ad eliminare i solidi sospesi non sedimentabili tramite chiariflocculazione. Tali trattamenti correggono le caratteristiche chimiche delle acque eliminando le sostanze incompatibili con l'utilizzo a cui l'acqua è destinata, ad esempio addolcimento, stabilizzazione, deferrizzazione, demanganizzazione, desilicazione, fluorazione e defluorazione, aerazione;
- Trattamenti di affinazione, articolati in più fasi e volti a migliorare le caratteristiche organolettiche dell'acqua tramite assorbimento su carboni attivi e ad abbassare il contenuto di solidi disciolti tramite demineralizzazione;
- Trattamenti di disinfezione, volti ad eliminare la presenza di microrganismi mediante clorazione.



*Figura 4: Schema riassuntivo delle varie fasi di potabilizzazione delle acque*

Ad eccezione del trattamento con raggi UV e della microfiltrazione la disinfezione comporta il contatto con sostanze chimiche di natura ossidante che lasciano “tracce” e alterazioni più o meno evidenti dell’acqua. Infatti, i composti del cloro determinano la formazione di derivati organoalogenati, sostanze dotate di una tossicità più o meno elevata in funzione della loro quantità, ad esempio il biossido di cloro, utilizzato in molti impianti determina la formazione di sostanze come i cloriti per i quali è stato definito un limite a 0,7 mg/L.

La clorazione, inoltre può determinare nelle acque trattate evidenti odori e sapori. In Italia il basso consumo dell’acqua di acquedotto è spesso imputabile a sapore ed odore non soddisfacenti. La responsabilità degli odori e sapori sgradevoli è imputabile anche alla presenza di acqua stagnante all’interno dei punti critici dell’impianto, all’interno dei quali si favorisce la formazione di biofilm.

Il biofilm viene definito come una comunità microbica costituita da microrganismi adesi irreversibilmente ad un substrato e immersi in una matrice esopolisaccaridica prodotta da essi stessi. (Dunne et al. 2002). Il biofilm così sviluppa una vera e propria nicchia ambientale che mantiene la giusta idratazione, agisce come barriera meccanica contro gli stimoli lesivi esterni, e intrappola nutrienti, altri microrganismi planktonici e materiale inerte, come minerali o prodotti di corrosione.

La produzione della 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 loro ed alla superficie. (Hall-Stoodley 2004, Donlan 2002)

Una volta adesi irreversibilmente i microrganismi colonizzano la superficie crescendo e moltiplicandosi. Dunque, il biofilm, oltre a provocare problemi operativi negli impianti idrici, è causa di problemi sanitari. Oltre ai batteri che partecipano alla biocorrosione, strettamente ambientali e non rilevanti dal punto di vista sanitario, tra i primi colonizzatori del biofilm sono segnalati microrganismi che fanno parte della flora microbica naturale delle acque, principalmente batteri pigmentati, a cui fanno seguito specie appartenenti ai generi *Flavobacterium*, *Arcobacter*, *Acinetobacter*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Bacillus*, attinomiceti e lieviti. Anche alcuni coliformi, come *Klebsiella pneumoniae*, sono spesso riscontrabili rispetto ad altre specie dello stesso gruppo, molto probabilmente perché hanno un maggior successo competitivo.

La tecnologia attuale consente il miglioramento dei caratteri organolettici dell'acqua applicando un trattamento con raggi ultravioletti integrato alla clorazione, mentre in alcuni acquedotti sono effettuati miglioramenti con l'impiego di ozono, un composto disinfettante che seppur inodore e insapore risulta instabile.

In ogni caso è indispensabile che vi sia sempre un'azione disinfettante residua, infatti il D.Lgs 31/2001 propone una concentrazione di disinfettante residuo di almeno 0,2 mg/L.

Lo stesso Decreto disciplina la qualità delle acque destinate al consumo umano al fine di proteggere la salute umana dagli effetti negativi derivanti dalla contaminazione delle acque imponendo che esse siano:

“salubri, pulite, non contaminate da microrganismi, parassiti e da sostanze in concentrazioni sufficientemente alte da rappresentare un pericolo per la salute”

(Articolo 4).

In via generale, le acque devono rispettare i requisiti minimi previsti nelle parti A e B e C dell'allegato 1 del D.Lgs. 31/2001.

Nell'Allegato A si prendono in considerazione i parametri microbiologici di *E.coli* ed Enterococchi, i quali devono risultare assenti in 100 ml di acqua. Fermo restando quanto disposto a giudizio dell'autorità sanitaria competente, potrà essere effettuata la ricerca concernente i seguenti parametri aggiuntivi: Alghe, Batteriofagi anti *E.coli*; Elminti; Enterobatteri patogeni; Funghi; Protozoi; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Legionella pneumophila*. Tali parametri devono risultare costantemente assenti.

Nell'Allegato B si prendono in considerazione i parametri fisici e i parametri chimici, tra cui i composti organoalogenati che devono essere mantenuti più bassi possibile, tuttavia il valore 30 µg/l è ritenuto cautelativo per la salvaguardia della salute pubblica.

Nell'Allegato C si prendono in considerazione 21 parametri indicatori, tra cui le proprietà organolettiche relative al sapore, odore, colore, torbidità dell'acqua e residuo fisso. Occorre tener conto che la composizione chimica delle acque potabili è variabile e risente delle diverse origini che può avere e dei processi di potabilizzazione e distribuzione a cui è sottoposta, infatti attraverso le condutture di uno stesso acquedotto possono fluire acque di differente composizione. È definito un limite per il residuo fisso a 180°C pari a 1500 mg/l.

### **2.3. LA SORVEGLIANZA IN AMBIENTE OSPEDALIERO**

Le legionelle sono state ritenute responsabili fino al 14% delle polmoniti ospedaliere, dal 15 al 30% delle numerose epidemie nosocomiali e dall'1 al

15% dei casi comunitari. (WHO. 2007). Tuttavia, poiché i test diagnostici per l'infezione da *Legionella pneumophila* non vengono eseguiti di routine in tutti i pazienti ricoverati che hanno una polmonite, si ritiene che l'incidenza della malattia sia sottostimata.

La sorveglianza della legionellosi nosocomiale deve rientrare, quando possibile, all'interno del protocollo di sorveglianza delle polmoniti nosocomiali (polmoniti insorte dopo almeno 48 ore dal ricovero) e il sospetto clinico dei medici riveste un ruolo fondamentale.

I principali obiettivi della sorveglianza della legionellosi in ambito ospedaliero sono:

1. monitorare, ai fini di programmazione e conoscenza, la frequenza della legionellosi sia dal punto di vista epidemiologico che clinico-nosologico, con particolare attenzione ai pazienti a rischio;
2. identificare prontamente variazioni del trend e cluster epidemici al fine di interrompere la trasmissione.

Pertanto, appare utile definire:

#### Strutture sanitarie a basso rischio

Strutture sanitarie, prive di reparti a rischio, in cui negli ultimi sei mesi non si sono riscontrati né casi di polmoniti da *Legionella pneumophila* di origine nosocomiale certa (o due casi di legionellosi possibile o probabile) né un isolamento significativo di *Legionella pneumophila* dall'impianto.

#### Strutture sanitarie ad alto rischio

Strutture in cui si è verificata almeno una di queste condizioni:

1. nell'arco degli ultimi sei mesi è stato individuato almeno un caso di legionellosi di certa origine nosocomiale;

2. nell'arco degli ultimi sei mesi sono stati individuati due o più casi di legionellosi nosocomiale probabile o possibile, senza dimostrazione di origine comunitaria;
3. nell'arco degli ultimi sei mesi è stata rilevata una contaminazione significativa dell'impianto;
4. esistenza nella struttura di reparti che ricoverano pazienti ad altissimo rischio (Trapiantati (soprattutto di midollo), Immunosoppressi/immunodepressi)

## **2.4. 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, 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; 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. 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.

È 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.

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

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) 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 pneumophila*: 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 pneumophila*, soprattutto nosocomiali, decorra misconosciuta.

Dalle raccomandazioni dell'OMS sulle modalità di valutazione e gestione del rischio idrico si evincono alcuni elementi indispensabili da considerare (Exner 2005).

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. 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:

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

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. 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.

Dal momento che *Legionella pneumophila*. 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 pneumophila* sia assumibile come paradigma della gestione generale del rischio idrico in ambiente sanitario correlato a patogeni idrodiffusi.

### **3. MATERIALI E METODI**

Il seguente lavoro di tesi è stato svolto presso il Laboratorio Panda srl di Sant'Omero (TE). Ha previsto l'analisi e la gestione del rischio *Legionella pneumophila* in strutture sanitarie del territorio abruzzese nelle province di Pescara Chieti e Teramo e l'implementazione di un metodo analitico per la determinazione qualitativa di questo microrganismo in campioni di acque potabili.



*Figura 5: logo Laboratorio Panda srl Sant'Omero (TE)*

### **3.1. SCOPO**

Questo documento specifica i metodi di coltura per l'isolamento della *Legionella pneumophila* e la stima del loro numero nei campioni di acqua.

Questi metodi sono applicabili a tutti i tipi di campioni d'acqua, comprese le acque potabili, industriali, di scarico e naturali. Questi metodi possono essere utilizzati per matrici legate all'acqua, ad es. biofilm, sedimenti, ecc.

Non tutte le *Legionella pneumophila* sono coltivabili quindi, i metodi descritti in questo documento non recuperano tutte le specie di *Legionella pneumophila*.

### **3.2. PRINCIPIO**

Le Legionelle nel campione d'acqua sono concentrate mediante filtrazione su membrana, diluite o direttamente placcate a seconda dell'origine/caratteristiche del campione. Il livello di rilevamento desiderato può variare a seconda della legislazione (inter)nazionale e del motivo del campionamento o dell'indagine. I campioni che si prevede contengano un numero elevato di *Legionella pneumophila* possono essere processati con e/o senza le fasi di concentrazione. Per ridurre la crescita dei batteri concentrati non bersaglio, che possono interferire con il recupero della *Legionella*

*pneumophila* bersaglio, porzioni dei campioni di acqua sono anche sottoposte a trattamento termico, acido o una combinazione di entrambi i trattamenti.

La diluizione è necessaria quando si prevedono alte concentrazioni di *Legionella pneumophila* e/o altri batteri. Porzioni separate del campione diluito devono essere pretrattate: una con calore e una seconda con soluzione acida o, in caso di campioni estremamente contaminati, con una combinazione di soluzione acida e calore prima della coltura su terreni selettivi.

Le porzioni trattate e/o non trattate dei campioni vengono trasferite su piastre del terreno di coltura selettivo scelto per *Legionella pneumophila* e incubate.

Dopo l'incubazione, le colonie morfologicamente caratteristiche sui terreni di coltura selettivi sono considerate come presunta *Legionella pneumophila*.

Le colonie presunte sono confermate come *Legionella pneumophila* dalla subcoltura per dimostrare il loro fabbisogno di crescita per L-cisteina e ferro (III).

### **3.3. PROCEDURA**

#### **3.3.1. CAMPIONI**

Al fine di garantire la rilevazione della *Legionella pneumophila* da campioni di acqua, nella maggior parte dei casi sarà necessaria una tecnica di concentrazione mediante filtrazione a membrana. Laddove si preveda che la concentrazione di *Legionella pneumophila* sia maggiore di  $10^4$  unità formanti colonia per litro (ufc/l), è possibile eseguire anche la semina diretta del campione non concentrato. Per campioni altamente contaminati, diluire e utilizzare la piastratura diretta prima e dopo il pretrattamento. Registrare i

volumi di campione diluito o trattato e quale/i pretrattamento/i è/sono stato/i applicato/i.

### **3.4. PRETRATTAMENTO DEL CAMPIONE**

#### **3.4.1. TRATTAMENTO TERMICO**

Aggiungere il campione (concentrato o no) in un contenitore sterile e metterlo a bagnomaria a  $50\pm 1^{\circ}\text{C}$  per 302 minuti. Utilizzare piccoli volumi (5 ml) per garantire un breve periodo fino al raggiungimento della temperatura desiderata. Se molti campioni vengono trattati insieme o vengono trattati grandi volumi di campione o vengono utilizzati contenitori a pareti spesse, monitorare la temperatura in un contenitore separato simile a quello utilizzato per il campione.

Il tempo inizia al raggiungimento della temperatura richiesta. Grandi volumi di campione o contenitori con pareti spesse devono essere raffreddati per evitare il surriscaldamento dopo essere stati rimossi dal bagnomaria.

#### **3.4.2. TRATTAMENTO ACIDO**

Diluire un volume del campione (concentrato o no) con nove volumi della soluzione acida, mescolare bene e lasciare per  $5\pm 0,5$  minuti. Se il campione trattato con acido diluito viene utilizzato per il calcolo della concentrazione finale di specie di *Legionella pneumophila* nel campione, la diluizione deve essere fattorizzata. Volumi superiori a 0,1 ml possono essere placcati per diminuire il limite di rilevabilità.

Il trattamento acido può essere effettuato anche direttamente sulla membrana filtrante nell'imbuto. Trasferire circa 30 ml di soluzione acida sulla membrana filtrante. Lasciare per  $5\pm 0,5$  minuti e rimuovere la soluzione acida tramite filtrazione. Lavare la membrana filtrante con almeno 20 ml di diluente. È importante che il diluente non sciacqui la superficie dell'imbuto che non è stata a contatto con la soluzione acida.

### 3.5. COLTURE

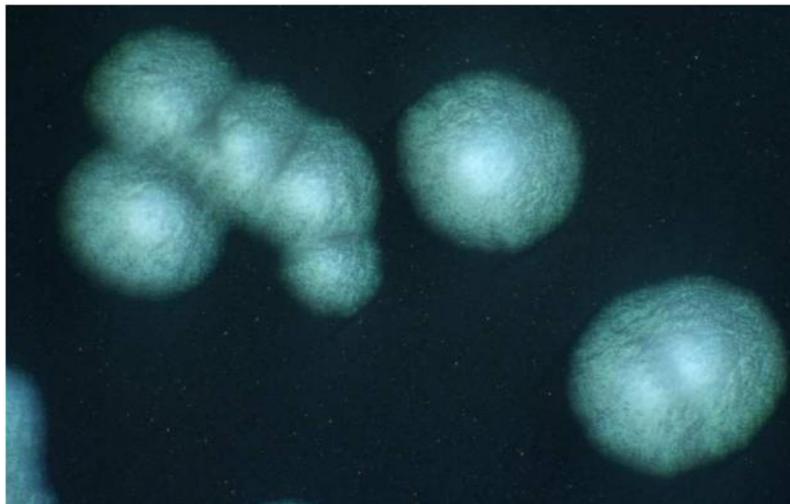
La scelta del metodo utilizzato per il conteggio delle specie di *Legionella pneumophila* dipende dall'origine/caratteristiche del campione e dal motivo del campionamento o dell'indagine. Si deve fare un'ipotesi sulla concentrazione prevista di microrganismi interferenti sulla base dell'esperienza o dell'origine del campione. Inoltre, è necessario considerare il limite inferiore desiderato del livello di rilevamento.

A seconda del livello di rilevamento desiderato, è possibile utilizzare più di una piastra dei diversi terreni di coltura menzionati nei seguenti sottopunti:

- Campioni con un'alta concentrazione di specie *Legionella pneumophila* e una bassa concentrazione di microrganismi interferenti: piastrare direttamente il campione se si prevede che il numero di *Legionella pneumophila* superi  $10^4$ cfu/l. Inoculare e distribuire da 0,1ml a 0,5ml del campione su una piastra di agar BCYE e una piastra di agar BCYE+AB. Registrare il volume inoculato.
- Campioni con una bassa concentrazione di specie *Legionella pneumophila* e una bassa concentrazione di microrganismi interferenti:
  - Posizionamento diretto del filtro a membrana sui terreni di coltura dopo la filtrazione: filtrare il campione e posizionare la

membrana filtrante non trattata direttamente su una piastra BCYE agar. Le membrane filtranti trattate con soluzione acida vengono poste su uno o più delle piastre selettive o altamente selettive di agar BCYE+AB o agar GVPC o agar MWY.

- Placcatura dopo filtrazione su membrana con procedura di lavaggio: inoculare e spargere da 0,1 ml a 0,5 ml di ciascuna porzione concentrata del campione (non trattata, trattata termicamente e trattata con acido) dalla filtrazione a membrana con procedura di lavaggio su una piastra di agar BCYE e su uno o più dei selettivi o altamente selettivi piastre di agar BCYE+AB o agar GVPC o agar MWY. Registrare il volume inoculato.



*Figura 6: Legionella pneumophila su BCYE agar*

- Campioni con alta concentrazione di microrganismi interferenti: campioni di coltura ad alta concentrazione di microrganismi interferenti non concentrati, concentrati o diluiti. Dividi ogni sottocampione in tre parti. Utilizzare una porzione non trattata, la seconda porzione per il trattamento a caldo e la terza porzione per il trattamento con soluzione

acida. Inoculare e distribuire da 0,1 ml a 0,5 ml di ciascuna porzione dei sottocampioni su una piastra di agar GVPC o una piastra di agar MWY. Registrare il volume inoculato.

- Campioni con una concentrazione estremamente elevata di microrganismi interferenti: campioni di coltura con una concentrazione estremamente elevata di microrganismi interferenti non concentrati e diluiti (1:10 e 1:100) dopo un pretrattamento con una combinazione di calore e acido. Per il trattamento combinato si esegue prima il trattamento termico seguito dal trattamento acido. È importante raffreddare il campione trattato termicamente a temperatura ambiente prima di eseguire il trattamento acido. Preparare le diluizioni subito dopo il trattamento acido in diluente sterile. Mescolare bene agitando, utilizzando un miscelatore a vortice o un bagnomaria ad ultrasuoni. Se necessario, aggiungere uno strato di perle di vetro sterili al campione per favorire la disaggregazione del materiale. Inoculare e distribuire da 0,1 ml a 0,5 ml di ciascuna porzione su una piastra di agar GVPC o una piastra di agar MWY. Registrare il volume inoculato.

### **3.6. INCUBAZIONE**

Incubare le piastre a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  per 7-10 giorni. È importante creare un'atmosfera umida per prevenire l'essiccazione delle piastre lasciando per esempio un po' aperto l'incubatorio.

### 3.7. ESAME DELLE PIASTRE

Esaminare le piastre ogni 2 giorni per valutare un'eccessiva crescita. Il risultato quantitativo va eseguito sempre dopo 7 giorni attraverso la tabella sottostante

Intralaboratory trial		
Range of quantitative determination	<ul style="list-style-type: none"> <li>— Single strain without interfering microorganisms between 10 cfu/plate and 300 cfu/plate.</li> <li>— Counts including interfering microorganisms 10 cfu/plate to 150 cfu/plate.</li> <li>— For the membrane filter technique with direct placing of the membrane filter on the plate 10 cfu/plate to 80 cfu/filter.</li> <li>— Always take into account that the growth of other microorganisms on <i>Legionella</i> culture media can strongly influence the growth of <i>Legionella</i> and that the range of quantitative determination has to be adapted to the specific situation.</li> </ul>	
Robustness of incubation time <sup>a</sup>	No significant difference in counts between 7 d and 10 d of incubation (n = 147).	
Robustness of the method using direct membrane filtration technique	Membrane filters, used for the method of placing the membrane filter directly onto the culture media, have a significant influence on the recovery of <i>Legionella</i> .	
Counting uncertainty [relative standard deviation (RSD)]		
<i>Repeatability (within laboratory)</i>	4,10 %	
<i>Reproducibility (within laboratory)</i>	5,40 %	
Precision (RSD) — direct plating		
<i>Repeatability (within laboratory)</i>	4,15 %	
<i>Reproducibility (within laboratory)</i>	8,23 %	
Precision (RSD) — membrane filter on plate		
<i>Repeatability (within laboratory)</i>	5,09 %	
<i>Reproducibility (within laboratory)</i>	11,86 %	
Precision (RSD) — filtration with washing procedure		
<i>Repeatability (within laboratory)</i>	6,04 %	
<i>Reproducibility (within laboratory)</i>	b	
Identification (categorical performance characteristics) (n = 1 067) <sup>c</sup>	Confirmation by subculturing on BCYE agar and BCYE-cys agar	Confirmation by PCR
<i>Sensitivity</i>	99,0 %	98,6 %
<i>Specificity</i>	95,3 %	97,5 %
<i>False-positive rate</i>	3,3 %	1,8 %
<i>False-negative rate</i>	1,4 %	2,1 %
<i>Selectivity</i>	57,2 %	58,1 %
<i>Efficiency</i>	97,5 %	98,1 %
<i>Recovery</i>	> 64 %	
<sup>a</sup> From interlaboratory trial.		
<sup>b</sup> The average relative operational standard deviation in intralaboratory reproducibility conditions observed during the characterization process was not significantly different from zero (ideal case).		
<sup>c</sup> The performance characteristics of the identification were also calculated based on the confirmation by PCR. Besides the confirmation of suspicious colonies by subculturing on BCYE agar and BCYE-cys agar, these colonies were also confirmed by an ISO/IEC 17025[2] accredited in-house PCR method. The small differences of the identification were caused by target and non-target colonies that were overgrowing each other.		

Parametri per le caratteristiche di performance per le prove interlaboratorio  
 Le colonie di *Legionella pneumophila* sono bianche e grigie ma possono apparire di altri colori, sono lisce con un contorno continuo e un aspetto vetrato. Sotto la luce UV le colonie emettono una fluorescenza bianca brillante. Per non danneggiare le cellule di *Legionella pneumophila* è importante non esporle per lungo tempo alla luce UV.

### 3.8. CONFERMA DELLE PRESUNTE COLONIE DI *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* SU AGAR BCYE E AGAR BCYE-CYS

Prelevare le presunte colonie di *Legionella pneumophila* e seminarle in una piastra di BCYE agar e in una piastra di agar BCYE-cys. Incubare a 36±2°C per 2-5 giorni. Controllare le colonie di *Legionella pneumophila* che crescono nell'agar BCYE ma non nel BCYE-cys.

#### B.1 Buffered charcoal yeast extract (BCYE) agar

##### B.1.1 Composition

Yeast extract (bacteriological grade)		10,0 g
Agar		12,0 g
Activated charcoal		2,0 g
α-ketoglutarate, monopotassium salt	(CAS No. 58485-42-0)	1,0 g
ACES buffer (N-2-acetamido-2-aminoethanesulfonic acid)	(CAS No. 7365-82-4)	10,0 g
Potassium hydroxide (KOH) (pellets)	(CAS No. 1310-58-3)	2,8 g
L-cysteine hydrochloride monohydrate	(CAS No. 7048-04-6)	0,4 g
Iron(III) pyrophosphate [Fe <sub>4</sub> (P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>3</sub> ]	(CAS No. 10058-44-3)	0,25 g
Water (see <a href="#">Clause 6</a> )		to 1 000 ml

Check manufacturer's recommendations for concentration of agar to be added to provide adequate gelling strength. All the water used for the preparation of culture media and supplements shall comply with the requirements of ISO 3696, grade 3 (see [Clause 6](#)).

## B.2 Buffered charcoal yeast extract agar without L-cysteine (BCYE-cys)

Prepare this culture medium in an identical manner to BCYE agar (see B.1) but omit the L-cysteine.

Allow excess moisture on the plates to dry and store at  $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$  in airtight containers in the dark for up to 3 months.

## 3.9. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il calcolo del numero di colonie di *Legionella pneumophila* avviene in accordo con la ISO 8199 come segue:

- Direct plating:  $C_s = \frac{a}{V_{\text{tot}}} \times V_s$
- Membrane filter on plate:  $C_s = \frac{a}{V_{\text{tot}}} \times V_s$
- Filtration with washing procedure (indirect filtration):  $C_s = \frac{a \times V_c}{V \times V_{\text{tot}}} \times V_s$
- Plating after dilution:  $C_s = \frac{a \times V_s}{V_{\text{dil}}} \times Df$

where

$C_s$  is the number of *Legionella* in cfu/l;

$a$  is the number of calculated confirmed *Legionella* colonies

$$a = \frac{\text{fraction positive confirmed}}{\text{fraction total confirmed}} \times \text{total count}$$

$V_c$  is the (concentrated) sample volume in millilitres, ml;

$V$  is the sample volume inoculated per plate or set of plates (from the same culture medium) in millilitres, ml;

$V_{\text{tot}}$  is the total tested sample volume in millilitres, ml;

$V_s$  is the reference volume chosen to express the concentration of the microorganisms in the sample (normally 1 000 ml);

$V_{\text{dil}}$  is the diluted sample volume inoculated per plate or set of plates (from the same culture medium) in millilitres, ml;

$Df$  is the dilution factor.

### 3.10. ASSICURAZIONE QUALITÀ

Il laboratorio ha definito un sistema di controllo qualità per garantire la funzionalità del metodo. L'uso di un controllo positivo, di un controllo negativo del bianco sono parte integrante del sistema controllo qualità. Per la definizione della produttività, selettività e specificità si utilizzano ceppi di *Legionella pneumophila* certificati. Il ceppo certificato viene piastrato su tre diverse tipologie di terreno: BCYE-cys agar, BCYE agar e BCYE+AB. Il primo terreno (BCYE-cys agar) serve per la conferma del ceppo *Legionella pneumophila* la quale, incubata a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  per 2-5 giorni non mostra crescita. Il terreno BCYE agar serve per determinare la produttività del metodo per la determinazione di *Legionella pneumophila* incubata a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  per 2-5 giorni, le colonie di *Legionella pneumophila* appariranno bianche-grigie-blu-viola con un contorno continuo e con un aspetto vetroso. Mentre il terzo terreno (BCYE+AB) serve per la determinazione della produttività e della selettività. La produttività di *Legionella pneumophila* viene determinata attraverso la crescita di *Legionella pneumophila* dopo incubazione a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  per 2-5 giorni, le colonie di *Legionella pneumophila* appariranno bianche-grigie-blu-viola con un contorno continuo e con un aspetto vetroso. La selettività viene determinata attraverso la totale inibizione di *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* nelle piastre incubate a  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  per 3 giorni. Questi controlli qualità vengono eseguiti ad ogni analisi.

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

I campioni totali analizzati sono stati 254, tutti prelevati da presidi ospedalieri. I punti di prelievo sono variabili e coincidono con rubinetti di bagni, camere da letto, cucine, sale operatorie, caldaie e serbati ad alta e bassa pressione appartenenti a diversi piani della struttura per rendere i campioni più rappresentativi possibili. Le modalità di campionamento sono state 2:

- pre-flush: prelievo effettuata dal rubinetto appena aperto, senza scorrimento dell'acqua con o senza flambatura,
- post-flush prelievo effettuato dopo aver allontanato parti mobili (rompigetto), pulito meccanicamente il punto di sblocco, flambato.

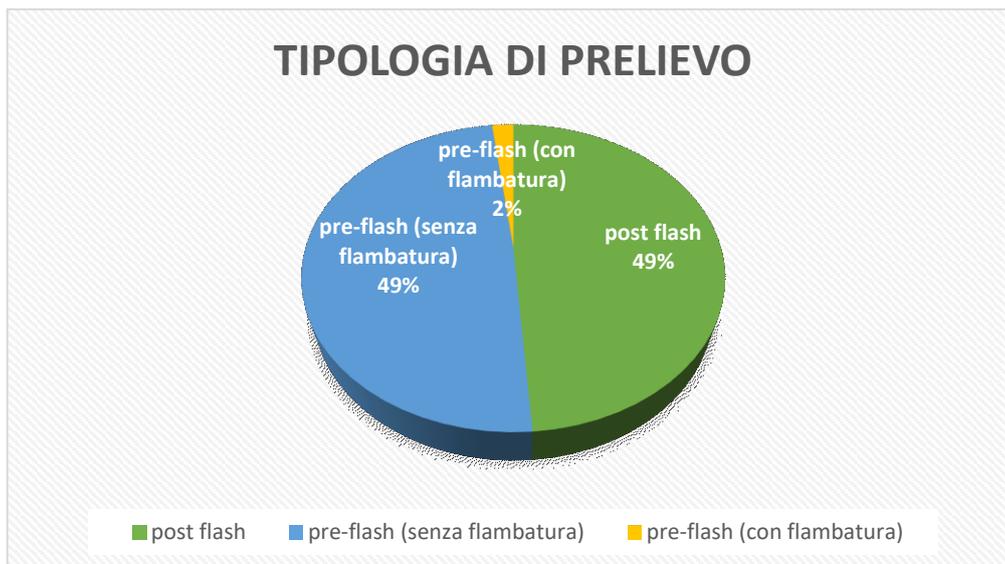
Come è possibile osservare dal grafico sottostante, su 254 campioni analizzati, 45 sono risultati positivi e 209 negativi, ovvero il 18% di positività e l'82% di negatività.



Campione	Luogo di prelievo
1	Centrale termica
2	Lavabo bagno sala gessi
3	Lavabo bagno reparto medicina donna
4	Lavabo bagno reparto malattie metaboliche
5	Lavabo bagno reparto oculistica
6	Lavabo bagno reparto chirurgia pediatrica
7	Lavabo bagno reparto rianimazione
8	Boiler alta pressione
9	Locale caldaia
10	Lavabo bagno assistito
11	Lavabo bagno assistito
12	Centrale termica alta pressione
13	Lavabo bagno reparto ginecologia
14	Lavabo bagno reparto farmacia
15	Centrale termica serbatoio n.1 alta pressione
16	Centrale termica serbatoio n.2 bassa pressione
17	Lavabo bagno reparto oculistica
18	Centrale termica serbatoio n.2 alta pressione
19	Lavabo bagno reparto anatomia patologica
20	Lavabo bagno sala d'attesa reparto oculistica
21	Lavabo antibagno degenza n.1 reparto chirurgia maxillo facciale
22	Lavabo bagno disabili n.8
23	Lavabo antibagno degenza n.5 reparto medicina post-flush
24	Lavabo antibagno degenza n.5 reparto medicina pre-flush
25	Lavabo bagno degenza n.5 reparto medicina

26	Lavabo antibagno degenza n.6 reparto medicina post-flush
27	Lavabo antibagno degenza n.6 reparto medicina pre-flush
28	Lavabo bagno pronto soccorso
29	Serbatoio n.2 alta pressione
30	Lavabo bagno sala gessi
31	Lavabo bagno reparto nefrologia/dialisi
32	Lavabo bagno sala infermieri
33	Lavabo stanza farmaci reparto chirurgia
34	Lavabo bagno reparto CSM
35	Lavabo antibagno infermieri reparto day hospital
36	Lavabo bagno sala medica day hospital
37	Serbatoio n.1 bassa pressione
38	Lavabo bagno medici
39	Lavabo bagno disabili
40	Lavabo stanza emergenza2 reparto pronto soccorso
41	Lavabo sala medicheria reparto chirurgia
42	Centrale termica
43	Locale caldaia
44	Lavabo cucina sala infermieri
45	Serbatoio n.2 alta pressione

Per quanto riguarda le modalità di campionamento, 5 sono prelevati in pre-flush con flambatura, 125 in pre-flush senza flambatura e 124 in post-flush; ovvero il 2% in pre-flush con flambatura, il 49% in pre-flush senza flambatura e il 49% in post-flush.

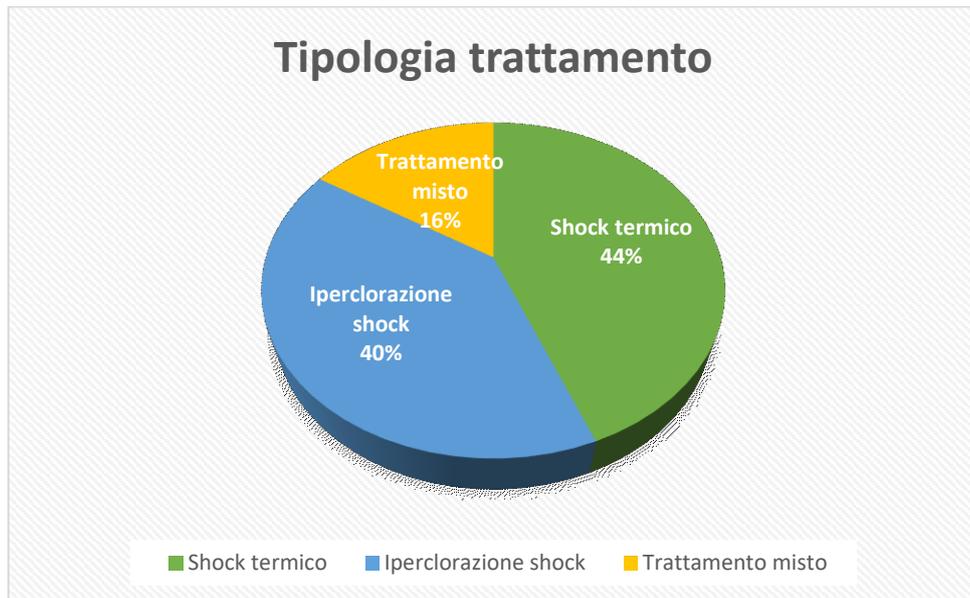


Sui 45 campioni positivi, 1 deriva da un campione prelevato in modalità pre-flush flambato; 18 pre-flush non flambato e 26 post-flush flambato. In seguito alla positività di tutti i 45 campioni, sono state eseguite azioni correttive che hanno previsto 3 tipologie di trattamento:

- Shock termico: consiste nell'elevare la temperatura dell'acqua a 70-80°C per tre giorni consecutivi raccomandando lo svuotamento preventivo dei serbatoi di acqua calda, la loro pulizia e la successiva decontaminazione con 100 mg/L di cloro per 12-14 ore e assicurando il suo deflusso da tutti i punti di erogazione per almeno 30 min al giorno.
- Iperclorazione shock: viene praticata, dopo aver disattivato il riscaldamento del boiler ed atteso il raffreddamento dell'impianto a temperature non superiori a 30°C, sull'acqua fredda di reintegro effettuando una singola immissione di disinfettante (ipoclorito di sodio o di calcio) fino ad ottenere concentrazioni di cloro residuo libero di 20 mg/L in tutta la rete, ivi compresi i punti distali. Dopo un periodo di contatto di 2 h per 20 mg/L di cloro, l'acqua presente nel sistema di distribuzione viene drenata e sostituita con una nuova immissione di

acqua fredda in quantità tale da ridurre la concentrazione di cloro residuo entro l'intervallo di 0,5-1,0 mg/L presso i punti distali dell'impianto.

- Combinazione dei due trattamenti in modo tale da ridurre la concentrazione di cloro che potrebbe rendere l'acqua non potabile e danneggiare alcuni tipi di tubature.



Come si osserva nel grafico, per il 44% dei campioni è stato effettuato sull'impianto uno shock termico, per il 40% è stato effettuato l'iperclorazione shock e per il 16% la combinazione dei due trattamenti.

In seguito a queste 3 tipologie di trattamenti per tutti i campioni positivi è stato ripetuto il prelievo sia in modalità pre-flush che in modalità post-flush; 28 sono risultati negativi e 17 positivi. Per questi 17 campioni si è supposto contaminato il rompigitto, il quale è stato sostituito e successivamente ripetuto il prelievo risultato in seguito negativo. I punti di prelievo di questi 17 campioni sono risultati essere, per lo più, di rubinetti di stanze ai piani più

alti delle strutture dove probabilmente i trattamenti correttivi effettuati risultano meno efficienti, in quanto per lo shock termico pur garantendo una buona efficacia, è di difficile attuazione in quanto spesso gli impianti non permettono il raggiungimento di dette temperature. Ha costi elevati in quanto richiede un elevato consumo di energia da non essere compatibile con le vigenti disposizioni in materia di risparmio energetico. La tenuta idraulica dell'impianto potrebbe essere compromessa da ripetuti shock termici soprattutto in presenza di tubazioni in materiale plastico. Durante il trattamento è necessario interdire l'uso dell'acqua calda sanitaria da parte degli utenti e degli operatori al fine di evitare il rischio di ustioni. Mentre per l'iperclorazione shock, ha un'azione fortemente corrosiva nei confronti dei materiali impiegati nelle reti idriche. Durante il trattamento è necessario interdire l'uso dell'acqua calda sanitaria da parte degli utenti e operatori al fine di evitare l'esposizione ad elevate concentrazioni del disinfettante.

Nella tabella sottostante vengono riepilogati i campioni positivi per i quali i trattamenti correttivi non hanno avuto efficacia e dove è possibile visualizzare la correlazione che c'è tra l'efficacia del trattamento e l'altezza degli edifici.

Campione	Trattamento	Piano
1	Shock termico	6
2	Shock termico	8
3	Shock termico	5
4	Shock termico	7
5	Shock termico	6
6	Iperclorazione shock	7
7	Iperclorazione shock	5
8	Iperclorazione shock	6

9	Iperclorazione shock	8
10	Trattamento misto	7
11	Trattamento misto	5
12	Trattamento misto	3
13	Iperclorazione shock	5
14	Iperclorazione shock	6
15	Shock termico	4
16	Shock termico	7
17	Shock termico	8

## 5. CONCLUSIONE

I dati epidemiologici riportati in letteratura dimostrano che dal 1976 ad oggi vi è stato un notevole aumento nel numero dei casi di legionellosi notificati per quanto ancora questa patologia risulti sottostimata. Pur essendo legionella un microrganismo che spesso causa il decesso di soggetti maggiormente a rischio, non sono state ancora emanate norme che rendano obbligatorie le attività di controllo e verifica della sua presenza nei circuiti idrici e di climatizzazione sia livello nazionale che in diversi Paesi europei. Solo 12 Paesi, tra cui non è compresa l'Italia, hanno emanato delle normative che impongono la registrazione e l'autocontrollo delle torri di raffreddamento e dei condensatori.

La mancata diagnosi e/o notifica dei casi di legionellosi sono le cause più importanti della sottostima, oltre alla scarsa sensibilizzazione al problema sia del personale sanitario che di quello del settore turistico ricettivo.

Il metodo EN ISO 11731:2017 che specifica metodi colturali per l'isolamento di stipiti batterici riferibili al genere *Legionella pneumophila* e per la

determinazione della relativa carica in campioni di acqua è stato correttamente implementato nel laboratorio nel quale ho svolto il periodo di tirocinio e il periodo di tesi. Il metodo è applicabile a qualunque tipo di acqua compreso le acque potabili, naturali, industriali e di scarico. Non tutte le specie di *Legionella* risultano coltivabili però il metodo è applicabile alla determinazione quantitativa di *Legionella pneumophila* oggetto di analisi.

I risultati ottenuti in questa ricerca, seppur preliminari, dimostrano la presenza di *Legionella pneumophila* negli impianti idrici monitorati. *Legionella pneumophila* è stata ritrovata in una quota rilevante e sicuramente non trascurabile delle strutture analizzate (18%).

La gestione del rischio idrico è stata incentrata negli ultimi anni alla ricerca di *Legionella* e la valutazione dei sistemi di disinfezione messi in atto per il controllo della colonizzazione all'interno delle reti idriche ospedaliere. Tuttavia, i dati epidemiologici di letteratura, dimostrano che oltre l'80% dei casi di Legionellosi diagnosticati risultano acquisiti in comunità, al di fuori dell'ambito ospedaliero.

Tutto ciò conferma l'importanza di estendere la sorveglianza e la prevenzione del rischi idrico anche all'ambito domestico. Secondo studi precedenti si stima un concreto rischio di infezione attraverso le docce, che favoriscono l'aerosolizzazione dell'acqua potenzialmente contaminata e la conseguente inalazione, senza trascurare molte altre attività domestiche le quali favoriscono l'esposizione a contatti prolungati con getti d'acqua che possono favorire infezioni da waterborne pathogens.

Le reti idriche ospedaliere, appartenendo a strutture datate, sono frequentemente ramificate e presentano rami morti non più utilizzati dove il ristagno dell'acqua può favorire la formazione di biofilm; queste reti rappresentano quindi un habitat ideale per la colonizzazione di *Legionella*. I

risultati inoltre evidenziano una maggiore frequenza di siti positivi in posizioni distali degli impianti, e ciò può essere dovuto ad un percorso più lungo della colonna d'acqua nelle tubature e di conseguenza alle basse concentrazioni di cloro residuo rilevate negli stessi punti. Una corretta manutenzione periodica degli impianti ospedalieri è essenziale e a tal proposito appare opportuno stimolare un'adeguata formazione di tutte le professionalità interessate nella gestione delle reti idriche (amministratori, idraulici, caldaisti), attraverso appositi corsi, per garantire la necessaria attenzione per la corretta attuazione delle misure di prevenzione e controllo necessarie.

Dai dati ottenuti dal presente lavoro è possibile sostenere quanto confermato da altri Autori, ossia che *Legionella* spp. è un microrganismo ubiquitario, facilmente riscontrabile negli impianti idrici, sia di piccole che di grandi dimensioni. A tal proposito è possibile valutare e gestire tale rischio mettendo in atto tutte le misure correttive volte ad eradicare o almeno minimizzare il pericolo.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Bates M. N., Maas E., Martin T., Harte D., Grubner M., and Margolin T., “Investigation of the prevalence of Legionella species in domestic hot water systems,” *N Z Med J.* 2000; 113: 218–220.
2. Borella P., Montagna M.T., Romano-Spica V. et al., “Legionella infection risk from domestic hot water, *Emerg Infect Dis.* 2004; 10: 457–464.
3. Casini B, Valentini P, Baggiani A, et al., “Molecular epidemiology of Legionella pneumophila serogroup 1 isolates following long-term chlorine dioxide treatment in a university hospital water system”, *J Hosp Infect.* 2008; 69: 141-7
4. Casini B, Buzzigoli A, Cristina ML, et al., “Long-term effects of hospital water network disinfection on Legionella and other waterborne bacteria in an Italian university hospital”, *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2014; 35: 293-9
5. Cristino S, Legnani PP, Leoni E, “Plan for the control of Legionella infections in long-term care facilities: role of environmental monitoring” , *Int J Hyg Environ Health.* 2012; 215: 279-85
6. Conferenza Stato-Regioni, Provvedimento 5 maggio 2000, G.U. n. 103 del 5 Maggio 2000, “Linee guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi”.
7. Conferenza Stato-Regioni, Provvedimento 13 gennaio 2005, G.U. n. 28 del 4 Febbraio 2005, “Linee guida recanti indicazioni sulla legionellosi per i gestori di strutture turistico-ricettive e termali”.

8. Decreto Legislativo 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.
9. Decreto Legislativo. 9 marzo 2002, n. 27. Modifiche ed integrazioni al decreto legislativo 2 febbraio 2001, n. 31, recante attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. Gazzetta Ufficiale n. 58 del 9 marzo 2002.
10. Garcia M.T., Jones S, Pelaz C, Millar RD, Abu Kwaik Y. *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection; *Environ Microbiol.* 2007; 9: 1267-77.
11. ISO 11731:1998 Water quality, Detection and enumeration of *Legionella*.
12. ISO 19458:2006 Water quality - Sampling for microbiological analysis.
13. ISO 6222:1999. Water quality - Enumeration of culturable microorganisms. Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium.
14. ISO 7899-2:2000 . Water quality . Detection and enumeration of intestinal enterococci Part 2: Membrane filtration method
15. ISO 9308-1:2014. Water quality - Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora
16. Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità, Istituto Superiore di Sanità, Volume 27 – Numero 10, Ottobre 2014
17. Rogers J, Dowsett AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW. Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system

- containing complex microbial flora. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 1585–92.
18. Comodo, N. & Maciocco, G. (2002). *Igiene e sanità pubblica* (Faber, C., Ed.).
  19. Martin, C., Pelaz, C. & Baladrón, B. (2000). 5th International Conference on Legionella, Ulm, Germany.
  20. Griffiths, J., . (2008.). *Waterborne Diseases*. (edition, E. I. E. o. P. H. t., ed.), Vol. 6,
  21. Carraro, E., Bonetta, S., Palombo, F., Gilli, G. & 40(1):117-140, A. I. S. S. (2004). Rischio microbiologico associato al consumo di acqua potabile nei paesi industrializzati. *Annuario Istituto Superiore di Sanità*
  22. Diederer, B.M.W. Legionella spp. and Legionnaires' disease. *Journal of infection* 2008; 56,1-12
  23. WHO. (2007). Legionella and the prevention of legionellosis. Hornei, B., Ewig, S., Exner, M., Tartakovsky, I., Lajoie, L., Surman-Lee, S., Fry, N. & Fields., B
  24. Fraser, D. W., T. R. Tsai, W. Orenstein, W. E. Parkin, H. J. Beecham, R. G. Sharrar, J. Harris, G. F. Mallison, S. M. Martin, J. E. McDade, C. C. Shepard, P. S. Brachman, and the Field Investigation Team. 1977. Legionnaires' disease. Description of an epidemic of pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 297: 1189-1197.
  25. McDade, J. E., C. C. Shepard, D. W. Fraser, T. R. Tsai, M. A. Redus, W. R. Dowdle, and the Laboratory Investigation Team. 1977. Legionnaires' disease. Isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N. Engl. J. Med.* 297: 1197-1203.
  26. McDade, J. E., D. J. Brenner, and F. M. Bozeman. 1979. Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947. *Ann. Intern. Med.* 90: 659-661.

- 27.(Declerck et al.2007; Fliermans et al.1981).
- 28.(Brabender et al.1983;Lowry et al. 1991; Lowry and Tompkins, 1993)
- 29.(Frazer et al.1977; Dc Dade et al.1979)
- 30.(Edelstein, 1993)
- 31.(Hall-Stoodley 2004, Donlan 2002)