



Università
Ca'Foscari
Venezia

Corso di Laurea Magistrale
in Scienze ambientali
Curriculum: Monitoraggio e risanamento dell'ambiente

Tesi di Laurea

La Legionella nell'acqua sanitaria

Analisi dell'incidenza e valutazione della distribuzione in campioni d'acqua sanitaria campionati tra giugno 2019 e dicembre 2022.

Relatore

Prof. Bessem Chouaia

Correlatore

Dott.ssa Angela Pizzol

Laureanda

Adriana Vita

Matricola 854377

Anno Accademico

2021 / 2022

INDICE

ABSTRACT

1. Introduzione	4
1.1 Le malattie idrotrasmesse	5
1.2 Legionella	5
1.2.1 Scoperta	5
1.2.2 Aspetti generali	5
1.2.3 Meccanismi di infezione ed espressione della malattia	8
1.3 Normative, linee guida e metodi	9
1.3.1 L'acqua ad uso umano	10
1.3.2 Piano di rischio Legionella	12
1.3.3 Misure di prevenzione e azioni correttive	15
1.3.4 Monitoraggio	17
1.4 Scopi e obiettivi	17
2. Materiali e metodi	18
2.1 Campionamento e conservazione dei campioni	18
2.2 Metodo utilizzato e fasi preliminare	18
2.3 Procedura analitica	20
2.4 Elaborazione ed espressione dei dati	23
3. Risultati e discussione	25
4. Conclusioni	37
5. Bibliografia e sitografia	38

ABSTRACT

La *Legionella* è un batterio ubiquitario, infatti è presente in tutti gli ambienti con una diffusione del 90%. L'uomo e il batterio del genere *Legionella*, quindi, vivono a stretto contatto.

A causa di variazioni di tipo ambientale e antropico, questi batteri proliferano e la loro concentrazione aumenta fino da superare i limiti imposti a norma di legge. Sono queste le condizioni che potrebbero potenzialmente causare l'espressione della malattia nell'uomo: la Legionellosi.

Per questo motivo è necessario attuare tutte le pratiche atte a prevenire, correggere e monitorare la proliferazione incontrollata del batterio.

Gli obiettivi di questo studio sono la determinazione dell'incidenza di *Legionella* in campioni d'acqua ad uso umano e la valutazione della sua distribuzione, per tipo di utenza e per sierotipo, in strutture ricettive e sanitarie. I dati ricavati sono, infine, rapportati alle fasce di intervento necessario da applicare in base alla concentrazione di Unità Formanti Colonia di *Legionella* su litro (UFC/l)

La metodologia analitica utilizzata per la determinazione delle concentrazioni nei campioni di acqua sanitaria è il metodo Membrana su agar e si basa sul deposito di membrana su piastra, utilizzato per ottenere l'isolamento dei batteri del genere *Legionella* e la determinazione del loro numero nei campioni di acqua.

Dalla successiva elaborazione dei dati si sono ottenuti dei risultati che dimostrano che circa il 34% dei campioni analizzati sia risultato positivo al batterio. Di questo 34%, il 55% sono campioni d'acqua prelevati da strutture sanitarie e il restante 45% da strutture ricettive. Inoltre, il 25% dei campioni positivi rispetto a quelli totali è stato prelevato da utenze come lavandini, docce, vasche o bidet.

Su questa base, si consiglia di effettuare tutte le pratiche necessarie e regolate a norma di legge, atte a limitare la potenziale pericolosità della *Legionella*. Particolare attenzione si deve porre alla presenza del batterio in corrispondenza delle utenze, che sono luoghi in cui quest'ultimo, se presente, e l'uomo sono a diretto contatto. Infine, in caso di presenza di *Legionella* in concentrazioni maggiori rispetto ai limiti imposti a norma di legge, è importante scegliere il trattamento adeguato in base all'intervallo nel quale è presente la concentrazione analizzata e al trattamento indicato in base all'intervallo stesso.

1. Introduzione

1.1 Le malattie idrotrasmesse

L'acqua è un bene essenziale per la sopravvivenza umana, per l'agricoltura e la zootecnica ed è considerato patrimonio dell'Umanità.⁷ È una risorsa limitata e vulnerabile. Ha un ruolo chiave per la vita ma anche per lo sviluppo economico e sociale. Per questi motivi bisogna cercare di preservarla. Essendo una risorsa essenziale, il suo deterioramento ha delle conseguenze che si ripercuotono sulla salute umana.⁵

L'acqua, infatti, è un importante vettore di diffusione di un vasto gruppo che comprende malattie di tipo virale, batterico e parassitario, causate principalmente da *Salmonella* (tifo e salmonellosi), *Shigella* (Shigellosi), *Campylobacter e E.coli* (gastroenterite), *Vibro cholerae* (colera), HAV (epatite A) *Legionella* (legionellosi), *rotavirus* (malattie diarroiche).

Gli organismi che causano le malattie portate dall'acqua sono oltre 400.

Oltre il 95% delle malattie idrotrasmesse sono prevenibili ma il restante 5% continua tutt'oggi a essere la principale causa di mortalità umana in tutto il mondo.⁷

I fattori che determinano l'ampia e rapida diffusione delle malattie idrotrasmesse sono principalmente legate alla non omogenea ripartizione della risorsa idrica, in termini di qualità e quantità, e alle condizioni igienico-sanitarie precarie. Per questo motivo, i paesi sottosviluppati sono maggiormente interessati dalla loro diffusione e i soggetti più colpiti sono solitamente i bambini. Secondo le stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), nel 2013 ci furono 760000 morti di bambini causati da acqua non potabile e mancanza di servizi igienici di base. Soprattutto le malattie diarroiche rimangono una delle principali cause di morte di bambini a livello globale.

Queste malattie hanno il loro massimo impatto sui bambini ma è anche vero che gli adulti non ne sono esenti. Negli anni '90, infatti, in Sud America, ci fu un gran numero di decessi, tra la popolazione adulta, causati dal colera.⁷

Queste problematiche non sono solo limitate alla parte di popolazione mondiale povera. Anche i paesi sviluppati sono interessati dalla diffusione di malattie idrotrasmesse, come la gastroenterite, l'epatite A e la legionellosi.⁷

Le principali vie di trasmissione di questi patogeni sono l'ingestione e l'esposizione diretta con acqua infetta. Dopo che la malattia si insinua all'interno di una popolazione attraverso l'acqua, va incontro a nuove vie di trasmissione come, ad esempio, il contagio tra individui.⁷

La prevenzione delle malattie idrotrasmesse è uno degli obiettivi di sviluppo sostenibile delle Nazioni Unite (Agenda 2030). Oltre allo sviluppo, dove non presente o presente ma non efficace, di un sistema sanitario, diagnostico, analitico ed epidemiologico adeguato, per prevenirne la diffusione bisogna

agire sul miglioramento dell'approvvigionamento idrico e delle infrastrutture, mediante la costruzione di pozzi, acquedotti, serbatoi di acqua piovana, così da limitare l'uso e il contatto con acqua superficiale non potabile e potenzialmente contaminata. Inoltre, è essenziale anche il miglioramento dei servizi igienico-sanitari, soprattutto rispetto la limitazione della contaminazione fecale.⁷

Il controllo e l'eliminazione delle malattie, quindi, sono l'obiettivo principale. Non vi è, però, la certezza assoluta che le azioni preventive e correttive intraprese siano sufficientemente efficaci, sia in termini di risorse che di tempo, per l'eliminazione del problema alla radice. Inoltre, non vi è, ancora oggi, una totale conoscenza rispetto tutti gli agenti eziologici, probabilmente perché spesso di origine vitale e sono, per ora, presenti solo un numero limitato di test di rilevamento accurati ed economici.⁷

1.2 Legionella:

Tra le malattie idrotrasmesse trattate nel capitolo precedente è stata citata la Legionellosi, patologia causata dai batteri del genere *Legionella*. Di seguito verranno introdotti gli elementi principali che li caratterizzano.

1.2.1 Scoperta

Il genere *Legionella* è stato scoperto nel 1976 in seguito a una, all'ora nuova, epidemia diffusasi al raduno della Legione Americana, al Bellevue Stratford Hotel di Philadelphia.⁹

Furono 34 le vittime e 221 i contagiati che svilupparono una forma di polmonite sconosciuta. In seguito, venne scoperto che l'agente eziologico responsabile della malattia era un batterio, che venne chiamato *Legionella pneumophila*. Le cause riconducibili alla diffusione del batterio furono additate al sistema di condizionamento dell'aria dell'albergo.⁹

Dopo la prima identificazione, grazie allo sviluppo di tecniche diagnostiche idonee per la sua rilevazione, venne identificata ovunque, soprattutto nei paesi industrializzati.¹⁴

1.2.2 Aspetti generali

Il genere *Legionella* include organismi procarioti, nello specifico batteri gram-negativi (vedi Figura 1), che appartengono all'ordine tassonomico delle Legionellales e alla famiglia Legionellaceae (vedi Tabella 1).



Figura 1 “*L.pneumophila* osservata al microscopio elettronico a trasmissione”.¹⁰

Dominio	Prokaryota
Regno	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	Gamma Proteobacteria
Ordine	Legionellales
Famiglia	Legionellaceae
Genere	'Legionella'

Tabella 1 Filogenesi del genere *Legionella*.¹⁰

Sono organismi aerobi, cioè hanno bisogno della presenza di ossigeno per poter svolgere le proprie funzioni vitali,³ provvisti di capsula e talvolta flagelli, aventi dimensioni comprese tra 0,3 e 0,9 μm per quanto riguarda la larghezza e tra 2 e 20 μm per la lunghezza.⁶

Sono incluse 61 specie diverse (Tabella 2) e 70 sierogruppi.¹⁴

Specie di <i>Legionella</i>	Numero di sierogruppi	Specie di <i>Legionella</i>	Numero di sierogruppi
<i>L. adalaidensis</i>		<i>L. maceachernii</i>	
<i>L. anisa</i>		<i>L. massiliensis</i>	
<i>L. beliardensis</i>		<i>L. micdadei</i>	
<i>L. birminghamensis</i>		<i>L. moravica</i>	
<i>L. bozemanii</i>	2	<i>L. nagasakiensis</i>	
<i>L. brunetti</i>		<i>L. nautarum</i>	
<i>L. busanensis</i>		<i>L. oakridgensis</i>	
<i>L. cardiaca</i>		<i>L. parisiensis</i>	
<i>L. cherrii</i>		<i>L. pittsburghensis</i>	
<i>L. cincinattiensis</i>		<i>L. pneumophila</i>	16
<i>L. drancourtii</i>		<i>L. pneumophila subsp. fraseri</i>	
<i>L. dresdenensis</i>		<i>L. pneumophila subsp. pascullei</i>	
<i>L. drozanskii</i>		<i>L. Pneumophila subsp. pneumophila</i>	
<i>L. dumoffii</i>		<i>L. quateirensis</i>	
<i>L. erythra</i>	2	<i>L. quinlivanii</i>	2
<i>L. fairfieldensis</i>		<i>L. rowbothamii</i>	
<i>L. fallonii</i>		<i>L. rubrilucens</i>	
<i>L. feeleii</i>		<i>L. sainthelensi</i>	2
<i>L. geestiana</i>		<i>L. santicrucis</i>	
<i>L. gormanii</i>		<i>L. shakespearel</i>	
<i>L. gratiana</i>		<i>L. spiritensis</i>	2
<i>L. gresilensis</i>		<i>L. steelei</i>	
<i>L. hackeliae</i>	2	<i>L. steigerwaltii</i>	
<i>L. impletisoli</i>		<i>L. taurinensis</i>	
<i>L. israelensis</i>		<i>L. tunisiensis</i>	
<i>L. jamestowniensis</i>		<i>L. tusconensis</i>	
<i>L. jordani</i>		<i>L. wadsworthss</i>	
<i>L. lansingensis</i>		<i>L. waltersii</i>	
<i>L. londiniensis</i>	2	<i>L. worsleiensis</i>	
<i>L. longbeachae</i>	2	<i>L. yabuuchiae</i>	
<i>L. lytica</i>			

Tabella 2 Specie di *Legionella*.¹⁴

Il 20% di queste specie sono note per essere responsabili dello sviluppo della malattia nell'uomo.⁶ Sono organismi ubiquitari e sono principalmente presenti negli ambienti acquatici naturali e artificiali, come acque superficiali (fiumi, laghi), fanghi, acque sorgive,¹⁴ piscine, acque termali, torri di raffreddamento¹, reti di distribuzione dell'acqua, linee idriche dei riuniti odontoiatrici⁴, ma anche nel suolo e nel compost.¹²

La *Legionella* ha una notevole capacità di proliferazione e di persistenza. Inoltre, è un organismo acido-tollerante e resistente anche a temperatura elevate; infatti, anche se il suo intervallo ottimale di temperatura è tra 32 e 42°C e si moltiplica a temperature comprese tra i 25 e i 45°C, sono state isolate specie di *Legionella* in ambienti la cui temperature raggiungevano picchi di 60°C.⁶

Grazie alla formazione di biofilm, ovvero matrici composte da aggregati eterogenei di batteri, funghi, protozoi e alghe, riescono facilmente a colonizzare parti di impianti idraulici. Le condutture degli impianti, ad esempio, sono luoghi ricchi dei nutrienti necessari a favorire la loro moltiplicazione.⁴ In seguito a variazioni ambientali che causano una degradazione del biofilm, le *Legionelle* si distaccano da quest'ultimo e passano allo stato planctonico, diffondendosi nell'acqua presente. In forma planctonica entrano in uno stato definito "vitale ma non coltivabile" che le rende resistenti ai biocidi e difficilmente isolabili.⁶

Inoltre, hanno la capacità di svilupparsi all'interno di altri organismi protozoi come *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella* e *Naegleria*.¹²

La specie più diffusa, e maggiormente diagnosticata, è la *Legionella pneumophila* ed è costituita da 16 sierogruppi.¹⁴

La Tabella 3 riassume le caratteristiche principali del genere *Legionella*.

Microrganismo	Batterio	Numero di specie	61
Colorazione Gram	Gram negativo	Numero di sierogruppi	70
Tipo di metabolismo	aerobico	Malattia associata	Febbre di Pontiac
Larghezza (µm)	0,3 - 0,9		Malattia dei Legionario
Lunghezza (µm)	2,0 - 20,0	Normativa di riferimento	UNI EN ISO 11731:2017
Morfologia	Forma bastoncellare	Diffusione ambientale	Acqua
	Presenza di capsula		Suolo
	Presenza di flagelli		Compost
		Intervallo di temperatura ottimale (°C)	32-42

Tabella 3 Caratteristiche genere *Legionella*.

1.2.3 Meccanismi di infezione ed espressione della malattia

Con il termine "Legionellosi" si fa riferimento a tutte le forme patologiche causate dai batteri del genere *Legionella*.¹⁴

Il contagio avviene tramite goccioline nebulizzate di acqua contaminata in docce, vasche idromassaggio, fontane, impianti idrici, torri di raffreddamento e in tutti quei luoghi nei quali l'acqua è presente sotto forma di aerosol, facilmente assimilabile attraverso l'apparato respiratorio. Non esistono riscontri di contagio tra uomo e uomo.²

La *Legionella pneumophila* sierogruppo 1 (SG1) è la maggior responsabile dell'espressione della malattia. Quest'ultima, dipende da molti fattori, tra cui la suscettibilità (che aumenta con l'età, il fumo, la presenza di malattie preesistenti) dell'individuo e il grado di intensità dell'esposizione. Ancora oggi non è nota la dose infettante per l'uomo, tantomeno il motivo della variabilità di virulenza tra specie e sierotipi.¹⁴

Fortunatamente, a prescindere dalla grande presenza del genere *Legionella* nell'ambiente, è raro lo sviluppo della malattia.¹⁴

La legionellosi può manifestarsi in due modi diversi, definiti Malattia o febbre di Pontiac e Malattia dei Legionari. La prima si presenta come una influenza acuta, che non interessa i polmoni e che causa un malessere generale, mal di testa e talvolta mal di gola e tosse. Ha un periodo di incubazione breve, massimo di quarantotto ore, e perdura per non oltre cinque giorni. Al contrario, invece, la Malattia del Legionario causa principalmente una polmonite infettiva interstiziale, ma può causare altri sintomi come febbre, tosse e dolore toracico. Ha un'incubazione che può arrivare fino a dieci giorni.¹⁴

1.3 Normative, linee guida e metodi

I batteri del genere *Legionella* non sono sempre responsabili dell'espressione della malattia, ma solo quando sono presenti in misura maggiore rispetto un limite di concentrazione di riferimento. Le concentrazioni di riferimento sono presenti nel documento denominato "linee guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi" e sono correlate alle diverse fasce di intervento da mettere in atto nel momento in cui tali concentrazioni vengono superate. Il documento è anche una guida essenziale per la conoscenza di tutti quegli aspetti relativi alla prevenzione e al monitoraggio dei batteri della specie *Legionella* nelle diverse matrici, alla sorveglianza, al protocollo di controllo del rischio, al campionamento e alla quantificazione. Le concentrazioni di riferimento vengono rapportate alle concentrazioni di Legionella, misurate con Unità Formanti Colonia su litro (UFC/l), stimate mediante il metodo analitico. La norma specifica per i metodi culturali, l'isolamento e la conta di Legionella è la UNI EN ISO 11731:2017. Tale normativa regola sia le acque potabili che non potabili e, oltre l'acqua, tutte le matrici ambientali ad essa correlate. Inoltre, ai fini della stesura di questo elaborato, sono state seguite anche le informazioni contenute nell'istruzione tecnica, denominata "Conta di Legionella", di PCR laboratori, dove vengono descritti i metodi culturali utilizzati da tale laboratorio, utili a ottenere l'isolamento dei batteri della specie *Legionella* e la loro stima nei campioni d'acqua.¹⁶

Sia nella normativa che nella guida, quindi, l'acqua viene classificata come acqua non potabile, come quella di piscina o come l'acqua di torre, e potabile, definita anche acqua sanitaria o acqua ad uso umano.

1.3.1 L'acqua ad uso umano

Quando si parla di acqua ad uso umano si intendono "acque trattate o non trattate, di uso potabile, per la preparazione di cibi e bevande o per altri usi domestici, a prescindere dalla loro origine, fornite tramite una rete di distribuzione oppure mediante cisterne, in bottiglie o in contenitori".¹¹ La prevenzione e il controllo dell'acqua potabile sono, quindi, molto

importanti proprio perché è una risorsa così essenziale. Il suo deterioramento, spesso, causa gravi conseguenze ambientali e alla salute umana. Per questo motivo vi è una rigida normativa che regola tutti gli aspetti che riguardano la prevenzione, il controllo, l'analisi e il monitoraggio di questa risorsa.

Sia ne “linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi” che nell’ISO 11731, l’acqua potabile viene definita “Acqua sanitaria” e si divide in “Acqua fredda sanitaria” (AFS) e “Acqua calda sanitaria” (ACS). Le strutture che utilizzano l’acqua sanitaria, che sono oggetto di questo elaborato, vengono definire strutture ricettive e strutture sanitarie. Come suggerisce il nome, l’acqua fredda sanitaria ha una temperatura inferiore e, allo scopo di mantenere livelli trascurabili di rischio di proliferazione di Legionella, la temperatura deve essere mantenuta non superiore a 20°C. L’acqua calda sanitaria, invece, deve essere mantenuta al di sopra di 50°C.¹⁴

Legionella (UFC/L)	Intervento richiesto
Sino a 100	Verificare che le correnti pratiche di controllo del rischio siano correttamente applicate.
Tra 101 e 1.000	In assenza di casi: Verificare che la struttura abbia effettuato una valutazione del rischio e che le misure di controllo elencate nelle presenti linee guida siano correttamente applicate. In presenza di casi: Verificare che siano in atto le misure di controllo elencate nelle presenti linee guida, sottoporre a revisione la specifica valutazione del rischio e effettuare una disinfezione dell'impianto
Tra 1001 e 10.000	In assenza di casi: -Se meno del 20% dei campioni prelevati risulta positivo l'impianto idrico deve essere ricampionato, almeno dagli stessi erogatori risultati positivi, dopo aver verificato che le correnti pratiche di controllo del rischio siano correttamente applicate. Se il risultato viene confermato, si deve effettuare una revisione della valutazione del rischio, per identificare le necessarie ulteriori misure correttive. L'impianto idrico deve essere ricampionato, dopo l'applicazione delle misure correttive. -Se oltre il 20% dei campioni prelevati risultano positivi, è necessaria la disinfezione dell'impianto e deve essere effettuata una revisione della valutazione del rischio, per identificare le necessarie ulteriori misure correttive. L'impianto idrico deve essere ricampionato, almeno dagli stessi erogatori risultati positivi. In presenza di casi: A prescindere dal numero di campioni positivi, è necessario effettuare la disinfezione dell'impianto e una revisione della valutazione del rischio, per identificare le necessarie ulteriori misure correttive. L'impianto idrico deve essere ricampionato dopo la disinfezione, almeno dagli stessi erogatori risultati positivi
Superiore a 10.000	Sia in presenza che in assenza di casi, l'impianto deve essere sottoposto a una disinfezione (sostituendo i terminali positivi) e a una revisione della valutazione del rischio. L'impianto idrico deve essere ricampionato, almeno dagli stessi erogatori risultati positivi.

Figura 2 Tipi di intervallo indicati per concentrazione di Legionella (UFC/L) negli impianti a rischio legionellosi, esercitati in strutture ricettive.¹⁴

Legionella (UFC/L)	Intervento richiesto
Sino a 100	Nessuno
Tra 101 e 1.000	<p>In assenza di casi: -Se meno del 30% dei campioni prelevati risulta positivo l'impianto idrico deve essere ricampionato, almeno dagli stessi erogatori risultati positivi, dopo aver verificato che le correnti pratiche di controllo del rischio siano correttamente applicate. Se il risultato viene confermato, si deve effettuare una revisione della valutazione del rischio, per identificare le necessarie ulteriori misure correttive.</p> <p>-Se oltre 30% dei campioni prelevati risulta positivo l'impianto idrico deve essere ricampionato, almeno dagli stessi erogatori risultati positivi, dopo aver verificato che le correnti pratiche di controllo del rischio siano correttamente applicate. Se il risultato viene confermato, si deve effettuare una disinfezione e una revisione della valutazione del rischio, per identificare le necessarie ulteriori misure correttive.</p> <p>In presenza di casi: A prescindere dal numero di campioni positivi, effettuare una revisione della valutazione del rischio ed effettuare una disinfezione dell'impianto.</p>
Tra 1001 e 10.000	<p>In assenza di casi: -Se meno del 20% dei campioni prelevati risulta positivo l'impianto idrico deve essere ricampionato, almeno dagli stessi erogatori risultati positivi, dopo aver verificato che le correnti pratiche di controllo del rischio siano correttamente applicate. Se il risultato viene confermato, si deve effettuare una revisione della valutazione del rischio, per identificare le necessarie ulteriori misure correttive.</p> <p>-Se oltre il 20% dei campioni prelevati risultano positivi, è necessaria la disinfezione dell'impianto e deve essere effettuata una revisione della valutazione del rischio, per identificare le necessarie ulteriori misure correttive. L'impianto idrico deve essere ricampionato, almeno dagli stessi erogatori risultati positivi.</p> <p>Si raccomanda un' umentata sorveglianza clinica, in particolare per i pazienti a rischio. Evitare l'uso dell'acqua dell'impianto idrico per docce o abluzioni che possano provocare la formazione di aerosol.</p> <p>In presenza di casi: A prescindere dal numero di campioni positivi, è necessario effettuare la disinfezione dell'impianto e una revisione della valutazione del rischio, per identificare le necessarie ulteriori misure correttive. L'impianto idrico deve essere ricampionato dopo la disinfezione, almeno dagli stessi erogatori risultati positivi.</p>
Superiore a 10.000	<p>Sia in presenza che in assenza di casi, l'impianto deve essere sottoposto a una disinfezione (sostituendo i terminali positivi) e a una revisione della valutazione del rischio. L'impianto idrico deve essere ricampionato, almeno dagli stessi erogatori risultati positivi.</p>

Figura 3 Tipi di intervallo indicati per concentrazione di Legionella (UFC/L) negli impianti a rischio legionellosi, esercitati in strutture sanitarie.¹⁴

Come si può vedere nelle figure 2 e 3, in base al numero di unità formanti colonia su un litro (UFC/l) risultanti dall'analisi di laboratorio, si ha un trattamento dell'impianto nullo o diverso.¹⁴

1.3.2 Piano di rischio Legionella

Il piano rischio Legionella si basa sul Protocollo del Rischio legionellosi delle linee guida. Si compone di tre fasi: Valutazione del rischio, gestione del rischio e comunicazione del rischio. La valutazione del rischio indica tutto ciò che causa un potenziale rischio di legionellosi nella struttura in analisi. Dopo aver raccolto tali informazioni, vengono comunicate all'incaricato della valutazione e gestione della struttura o a un suo preposto che, a loro volta, hanno il compito di informare tutti gli individui coinvolti nel controllo e nella prevenzione della suddetta struttura. Per le strutture sanitarie deve essere valutata ogni 12 mesi, per le strutture ricettive ogni 24 mesi.¹⁴

La gestione del rischio comprende tutte quelle procedure atte a rimuovere o contenere le criticità individuate.¹⁴

In ultima, la comunicazione del rischio include tutte le azioni utili a informare e formare tutti i soggetti interessati da tale rischio.¹⁴

Il piano di rischio *Legionella* viene creato solo per quelle strutture nelle quali vi è un potenziale rischio di *Legionella* e solo in seguito a un sopralluogo effettuato da tecnici formati a tale scopo.¹⁵

Il piano di rischio Legionella è costituito dalle seguenti sezioni:

- Sezione 1: Censimento della struttura e raccolta dati come le figure responsabili, tipologia di struttura, periodo di esercizio, numero e tipo di utenze, impianti di stoccaggio e approvvigionamento e accumulo dell'acqua fredda sanitaria e acqua calda sanitaria;
- Sezione 2: Valutazione del rischio dell'acqua sanitaria, dell'aria, delle torri di raffreddamento, delle piscine e di tutte le matrici che sono oggetto di rischio per quella data struttura.¹⁵

Il metodo di calcolo del rischio viene effettuato assegnando un punteggio per il calcolo del grado di rischio di proliferazione per ogni utenza. Dal momento che, il fattore di rischio nel contrarre la legionellosi si basa sulla tipologia di impianto dal quale viene erogata l'acqua e alla potenziale formazione di aerosol, è stato associato a ogni tipo utenza un punteggio più o meno alto in base al rischio associato. Alle utenze considerate maggiormente rischiose è stato associato un punteggio maggiore. Se l'impianto non genera aerosol oppure lo genera ma in modo poco rilevante, il rischio legionellosi risulterà essere inferiore rispetto al suo rischio di proliferazione.¹⁵

Nella figura 4, qui di seguito, è rappresentato un esempio di punteggio associato alle diverse utenze, in base al diverso grado di rischio:

Lavandino bagno: x0,25	Bidet: x0,25	Lavello cucina con normale aeratore: x0,25	Lavello cucina con doccetta: x0,75	Doccia: x1
---------------------------	-----------------	--	--	---------------

Figura 4 Fattori relativi a ogni tipologia di erogazione, secondo la quantità di aerosol che può essere generata.¹⁵

Dalla figura si può capire che l'utenza considerata più rischiosa è la doccia e quelle considerate meno rischiose sono il lavandino del bagno, il bidet e il lavello della cucina con normale aeratore.¹⁵

Tale punteggio viene poi moltiplicato per il numero di utenze presenti per ogni tipologia. Il risultato viene confrontato con la seguente tabella (Tabella 4), che mette in relazione il punteggio finale e il rischio di proliferazione:

TABELLA DI RELAZIONE PUNTEGGIO/RISCHIO PROLIFERAZIONE				
≤2 RP BASSO	3>5 RP MEDIO-BASSO	6>10 RP MEDIO	11>15 RP MEDIO-ALTO	16>20 RP ALTO

Tabella 4 Tabella di relazione punteggio/rischio di proliferazione.¹⁵

In ultima viene assegnato il grado di rischio e tutti i punteggi, con i relativi colori associato rispetto l'intervallo in cui sono contenuti, vengono inseriti in una tabella simile al prototipo presente nella tabella 5:

ID UTENZA/IMPIANTO	CALCOLO RISCHIO PROLIFERAZIONE					RISCHIO LEGIONELLOSI				
	PAD	PAC	PAL	FT	RP	LB	BD	DC	LC	LCD
STRUTTURA PRESA IN ESAME:	"Tipo di struttura"									
AFS – DISTRIBUZIONE – 0 < T °C < 20										
AFS – DISTRIBUZIONE – 21 < T °C < 49										
STRUTTURA PRESA IN ESAME:	"Struttura in esame"									
ACS – ACCUMULO										
ACS – RICIRCOLO										
ACS – DISTRIBUZIONE GENERALE										
STRUTTURA PRESA IN ESAME:	"Struttura in esame"									
ACS – BOLLITORE										
ACS – RICIRCOLO										
ACS – DISTRIBUZIONE GENERALE										

Tabella 5 Tabella riassuntiva del grado di rischio.¹⁵

Nella prima colonna della tabella 5 sono elencate le utenze e gli impianti presenti nella struttura per la quale è stato stilato il piano di rischio. La figura 5 rappresenta la leggenda di queste voci.¹⁵

LEGENDA ASSEGNAZIONE DEL GRADO DI RISCHIO			
PAD	Punteggio addolcimento	FT	Fattore temperatura
PAC	Punteggio dosaggio antincrostante	FRL	Fattore rischio legionellosi
PAL	Punteggio dosaggio antilegionella	RL	Rischio legionellosi
RP	Rischio proliferazione	LB	Lavandino bagno
LC	Lavello cucina	BD	Bidet
LCD	Lavello con doccetta	DC	Doccia

Figura 5 Leggenda assegnazione del grado di rischio.

Per ognuna di queste è assegnato il valore risultante dal calcolo di rischio proliferazione, nella seconda colonna, e del rischio legionellosi. In base al valore inserito all'interno dei riquadri, è presente il relativo colore, come già visto nella Tabella 4.¹⁵

- Sezione 3: Gestione del rischio con gli scadenziari della manutenzione: in queste parte vengono indicati tutti gli interventi di trattamento, manutenzione e controllo da applicare in base ai risultati tratti dalla valutazione del rischio. Possono riguardare, ad esempio, il controllo della temperatura, applicazione di trattamenti preventivi o correttivi e ispezione dei serbatoi. Inoltre, viene anche segnalato lo stato attuale degli interventi: in verde se l'intervento è stato rispettato, in giallo se l'intervento può essere migliorato, in rosso se l'intervento non è applicato, in grigio se l'intervento non è presente. Vengono anche indicati i possibili miglioramenti e la frequenza attuale e consigliata degli interventi di manutenzione.¹⁵
- Sezione 4 Campagna di campionamento: viene indicato il numero, la frequenza, il luogo e la modalità di campionamento più adeguata;¹⁵
- Sezione 5 Flussaggio delle utenze: questa sezione è molto importante perché dà indicazioni sulla frequenza e i tempi di flussaggio delle utenze interessate nella strutta in analisi. La Legionella prolifera soprattutto nelle acque stagnanti e, per minimizzare il rischio, nel Piano vengono indicati, soprattutto per quelle utenze che vengono utilizzate meno frequentemente, tutte le indicazioni necessarie per effettuare il flussaggio di tali utenze.¹⁵
- Sezione 6: Riepilogo registri di manutenzione.¹⁵

1.3.3 Misure di prevenzione e azioni correttive

I metodi di prevenzione e di controllo del sistema idrico, attuati per prevenire e contenere la contaminazione, e si dividono in misure a breve termine e misure a lungo termine.

Le misure a breve termine sono le seguenti:

- Decalcificazione degli elementi meno usuranti con l'uso di una soluzione acida. Successivamente si attua una disinfezione con acqua e cloro libero per almeno 30 minuti;
- Sostituzione di tutti gli elementi di discontinuità, come tubi, soffioni, filtri, con una frequenza che dipende dalla durezza dell'acqua.¹⁴

Le misure a lungo termine sono le seguenti:

- Filtrazione al punto di utilizzo: consiste in una microfiltrazione, mediante l'uso di filtri, che ha lo scopo di rimuovere totalmente la *Legionella* in uscita al punto di utilizzo;
- Trattamento termico: l'acqua all'interno degli impianti viene mantenuta a una temperatura maggiore di 50°C per impedire la proliferazione di *Legionella*. I metodi utilizzati sono lo shock termico e la disinfezione termica. Il primo consiste nel mantenimento della temperatura dell'acqua tra i 70 e gli 80°C per tre giorni e 30 minuti al giorno di deflusso di tutti i punti di somministrazione. La disinfezione termina, invece, si effettua prima innalzando la temperatura dell'acqua fino a 65°C per poi inibire la miscelazione con acqua fredda e, infine, si fa circolare, per 30 minuti al giorno, l'acqua a una temperatura compresa tra 55°C e 60°C per tutto l'impianto.
- Irraggiamento UV: viene utilizzato la luce ultravioletta a 254 nm per dimerizzare la timina del DNA batterico così da non permettere loro di replicarsi;
- Clorazione: i metodi di clorazione sono l'iperclorazione shock e l'iperclorazione continua. La prima consiste nell'uso di concentrazioni di cloro residuo, derivanti dall'ipoclorito di sodio o di calcio, comprese tra 20 e 50 mg/L all'interno dell'impianto per un intervallo di tempo compreso tra 1 e 2 ore, in base alla concentrazione di cloro presente. Invece, l'iperclorazione continua consiste nella continua immissione di cloro, introdotto sotto forma di ipoclorito di calcio o di sodio, ad una concentrazione compresa tra 1 e 3 mg/L;
- Disinfezione con biossido di cloro: rispetto il cloro, il biossido di cloro risulta essere più efficace per il trattamento di biofilm, in funzione dei materiali impiegati;
- Ozonizzazione: l'ozono viene aggiunto all'acqua dell'impianto a una concentrazione compresa tra 1 e 2 mg/L con lo scopo di inibire la proliferazione di *Legionella*

mediante la sua capacità di agire sul DNA dei microrganismi, danneggiandolo in modo irreversibile;

- Disinfezione con monocloramina: consiste nell'immissione nell'acqua di concentrazioni comprese tra 2 e 3 mg/L. Ha la stessa modalità di azione del cloro ma è più persistente, ed è per questo avvantaggiato perché agisce anche in zone stagnanti e all'interno del biofilm.
- Ionizzazione rame-argento: il rame e l'argento causano una variazione della permeabilità della parete del microrganismo e, in aggiunta alla denaturazione proteica, anche la lisi cellulare;
- Disinfezione con perossido di idrogeno e ioni di argento: Tale metodo sfrutta l'azione battericida del perossido di argento e di ioni di argento;
- Disinfezione con acido peracetico.¹⁴

Sia le strutture ricettive che le strutture sanitarie possono incorrere in contaminazioni da *Legionella*. Come già descritti in precedenza, il primo aspetto importante è il mantenimento dell'Acqua calda sanitaria e dell'Acqua fredda sanitaria, rispettivamente, a temperature maggiori di 50°C e minori di 20°C, allo scopo di inibire la proliferazione di *Legionella*. Oltre ciò, è importante effettuare un'iperclorazione shock, o una misura alternativa tra quelle precedentemente descritte, almeno una volta l'anno e in seguito a lavori che possono aver causato contaminazioni. È necessario svuotare, pulire e disinfettare i bollitori e i serbatoi con una frequenza di due volte l'anno e, mensilmente, ispezionare i serbatoi, accertandosi che tutte le coperture sia intatti e posizionate correttamente. In ultima, utilizzare, tra quelli precedentemente descritti, le misure più idonee se si è in presenza di una contaminazione generalizzata dell'acqua all'interno dell'impianto e infine, provvedere a un efficace trattamento dell'acqua in grado di prevenire, oltre alla proliferazione di *Legionella*, la formazione di biofilm.¹⁴

1.3.4 Monitoraggio

Il monitoraggio delle matrici si effettua in seguito al processo di analisi e all'applicazione dei trattamenti correttivi. È una fase essenziale che serve a valutare se vi è la necessità di mettere in atto le azioni correttive opportune per “tenere sotto controllo” l'eventuale proliferazione incontrollata del batterio nella matrice analizzata.¹⁴

Il primo monitoraggio viene effettuato dopo 48 dalla disinfezione. Se il risultato di questo controllo risulta essere negativo, allora se ne effettua un secondo un mese dopo. Se anche

questo risulta essere negativo allora il terzo controllo verrà effettuato dopo tre mesi. In caso di negatività, l'ultimo viene eseguito dopo sei mesi o periodicamente in base a quanto indicato nel Piano di controllo del rischio. In caso di positività di uno dei controlli bisogna valutare nuovamente le fasi da seguire per correggere la contaminazione.¹⁴

1.4 Scopi e obiettivi

Gli scopi di questo lavoro sono:

- la determinazione dell'incidenza di *Legionella* in campioni ad uso umano, in un intervallo di tempo che va da giugno 2019 a dicembre 2022;
- la valutazione della distribuzione di *Legionella*, per tipo di utenza e per sierotipo, in strutture ricettive e sanitarie nello stesso intervallo di tempo.

I risultati verranno poi confrontati con le figure 2 e 3.

2. Materiali e metodi

2.1. Campionamento e conservazione dei campioni

La normativa che regola il campionamento della *Legionella* è la UNI EN ISO 19458:2006 intitolata “Water quality – Sampling for microbiological analysis”. Vengono utilizzate bottiglie di vetro o di varie plastiche (polipropilene, polietilene, policarbonato ecc), sterili e di volume variabile.¹³

Bisogna assicurarsi che a ridosso del punto di campionamento non vi siano potenziali contaminazioni presenti nella parte esterna e superficiale, come calcare, melma o altri corpi estranei che potrebbero cadere e inquinare il campione. È necessario che l’utenza venga disinfettata preventivamente con fiamma o con altri metodi. Bisogna lasciare l’acqua scorrere a lungo prima di prelevarla, per ridurre al minimo l’influenza della rete di potabilizzazione e per garantire l’assenza di effetti termici o presenza di disinfettanti residui. Infine, si posiziona la bottiglia aperta sotto il flusso dell’acqua per riempirla, mantenendo la condizione asettica.¹³

Successivamente i campioni vengono conservati in frigorifero a (5 ± 3) °C e analizzati entro 48 ore dal campionamento.¹⁶

2.2. Metodo utilizzato e fasi preliminari

Il procedimento analitico da applicare alla matrice di interesse è definito nell’allegato J della norma ISO11731:2017. Secondo quest’ultima, gli elementi da considerare sono l’origine del campione, la presenza o meno di interferenti (l’acqua ad uso umano è considerata una matrice a basso contenuto di interferenti), i livelli di rilevabilità, l’intervallo di concentrazione d’interesse usato per il confronto con i limiti di leggi e i vantaggi e gli svantaggi del metodo utilizzato.¹⁶

Il metodo analitico utilizzato per l’analisi di campioni di acqua sanitaria è il metodo Membrana su agar mediante rampa di filtrazione (Figura 6)^{14, 16}



Figura 6 Rampa di filtrazione.

La rampa di filtrazione è in acciaio inox e può essere formata da tre o sei unità filtranti. Le unità filtranti sono costituite a loro volta da un imbuto rimovibile e da una superficie filtrante, sul quale si posiziona il filtro durante la filtrazione dei campioni.

Le preparazioni preliminari riguardano la preparazione del tampone acido e della soluzione Ringer. Per il primo vengono utilizzati 12,70 g di cloruro di potassio (KCl), 850 ml di acqua osmotizzata; 130 ml di soluzione A e 20 ml di idrossido di potassio (KOH), La soluzione A è una soluzione di acido cloridrico 0,2 molare formata da 17,4 ml di acido cloridrico concentrato al 37% su un litro di acqua osmotizzata. La soluzione Ringer utilizzata è il risultato della diluizione 1 a 10 di un quarto di soluzione Ringer madre, come descritto nella norma ISO 8199.¹² Il pH finale è di (7.0 ± 0.2) a 25°C. Le soluzioni Madre vengono conservate per un massimo di tre mesi a temperatura ambiente. Il tampone acido e la soluzione Ringer diluita vengono conservate per massimo un mese.¹⁶

Sia il tampone acido sia la soluzione Ringer vengono sterilizzati in autoclave a (121 ± 3) °C per (15 ± 1) minuti.¹⁶

Prima di incominciare la vera e propria procedura analitica, si attua la sterilizzazione della rampa di filtrazione con fiamma, per un tempo di almeno 30 secondi a imbuto e si attende che si raffreddi, fino ad arrivare a una temperatura di 30-40 °C.¹⁶

La procedura analitica differisce in base all'origine del campione, cioè se i campioni d'acqua derivano da strutture ricettive o sanitarie. La Tabella 6 rappresenta i diversi elementi che li caratterizzano.

Tipo di struttura	Matrice	Tecnica	Trattamento	Terreno	Volume analizzato (ml)	Limite inferiore (UFC/l)	Limite superiore (UFC/l)	Codice prova (LIMS)
Sanitaria	Acqua sanitaria	Membrana su agar	Senza trattamento (ST)	BCYE	100	10	1000	13
			Trattamento acido (TA)	GVPC	100	10	1000	
					10	100	10000	
Ricettiva	Acqua sanitaria	Membrana su agar	Senza trattamento (ST)	BCYE	10	100	10000	14
			Trattamento acido (TA)	GVPC	10	100	10000	

Tabella 6 La tabella descrive le tecniche, i trattamenti, il tipo di terreno e i limiti di rilevabilità che caratterizzano l'analisi di campioni di strutture ricettive e sanitarie.¹⁶

In base alla diversa origine dei campioni da analizzare, si usa un procedimento analitico che può variare in alcune sue parti.

Dalla Tabella 6 si può capire che:

- Il metodo utilizzato in tutti i campioni di acqua sanitaria è definito metodo Membrana Agar, ovvero un metodo che richiede l'utilizzo di filtri sterili di nitrocellulosa e rampe di filtrazione;

- I campioni possono essere sottoposti a due tipi di trattamento: assenza di trattamento oppure trattamento acido;
- Il terreno Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) è un terreno standard per la crescita di *Legionella spp* non selettivo; viene utilizzato sia per campioni di acqua derivanti da strutture sanitarie, con un volume analizzato di 100 ml, sia per quelli derivanti da strutture ricettive, con un volume analizzato di 10 ml;
- Il terreno Glycine Vancomycin Polymyxin Cycloheximide (GVPC) agar è un terreno standard selettivo per la crescita di *Legionella spp*; viene utilizzato sia per campioni di acqua prelevati da strutture sanitarie, con volumi analizzati di 10 ml e 100 ml, sia per quelli prelevati da strutture ricettiva, con un volume analizzato di 10 ml;
- Per i campioni prelevati da strutture sanitarie, l'intervallo di concentrazione di interesse per il confronto con i limiti di legge¹⁶ è dalle 10 UFC/l e alle 10000 UFC/l. Invece, per i campioni prelevati da strutture ricettive, l'intervallo va dalle 100 UFC/L a 10000 UFC/l.

2.3. Procedura analitica

Dopo la fase preliminare, inizia la fase della vera e propria fase analitica. La prima cosa da fare è il posizionamento dei filtri sterili di nitrocellulosa, aventi diametro dei pori di 0,45 µm, sulla superficie filtrante della rampa di filtrazione. Prima procedere, si agita il campione secondo i tempi indicati nella Tabella 7 e successivamente si versa il volume indicato nella tabella 6, all'interno dell'imbuto della rampa di filtrazione.

Serie	Tipo di struttura							
	Struttura sanitaria				Struttura ricettiva			
	Agitazione	Volume	Trattamento	Terreno	Agitazione	Volume	Trattamento	Terreno
1	30 x 2 s	10	acido	GVPC	30 x 2 s	10	acido	GVPC
2	15 x 2 s	100	acido	GVPC	15 x 2 s	10	-	BCYE
3	10 x 2 s	100	-	BCYE	-	-	-	-

Tabella 7 Tempi di miscelazione riferiti al numero di serie di campioni di strutture ricettive e sanitarie.¹⁶

Questo passaggio è fondamentale perché serve a rendere omogeneo il campione e non incorrere in stime della concentrazione errate. Successivamente si avvia il processo di filtrazione aprendo i rubinetti per ogni singolo imbuto. Si ripete questa operazione per tutti i campioni e per tutte le serie. Per i campioni dove è richiesto effettuare il trattamento acido si versano 30 ml di tampone acido all'interno di ogni imbuto e dopo aver atteso cinque minuti, si filtra il tutto. Si versano e si filtrano, senza tempi di attesa, 20 ml di soluzione Ringer per neutralizzare l'azione acida del tampone

precedentemente inserito.¹⁶ Infine, si preleva ogni filtro e lo si inserisce all'interno della capsula Petri contenente il terreno.

Tutte le piastre vengono inserite capovolte all'interno di un incubatore (36 ± 2) °C, all'interno di contenitori chiusi ma non sigillati per prevenire l'essiccamento dell'agar.¹⁶

Dalla lettura delle piastre si ha come risultato la stima delle colonie presunte presenti sulle piastre.

La lettura delle piastre viene effettuata al quarto, al settimo e al decimo giorno da quando è stata effettuata la filtrazione dei campioni. Per campioni aventi concentrazioni molto elevate di batteri, la formazione delle colonie potrebbe risultare visibile già al primo controllo. Generalmente, per campioni con concentrazioni non eccessive del contaminante, la formazione delle colonie risulta essere visibile dal secondo controllo.¹⁶

Sui terreni BCYE, ma anche GVPC, possono svilupparsi anche colonie che non sono del genere *Legionella*. Per questo motivo, nella ISO 11731:2017 sono descritte le caratteristiche che hanno le colonie del genere *Legionella* e che permettono, a un tecnico esperto, di distinguere le colonie di interesse rispetto le altre.¹⁶ Le colonie di *Legionella* si possono presentare con forme e colori diversi. Le caratteristiche sono presenti nella Figura 7.

Forma della colonia	Puntiforme	
	Rotondo	
Margine	intero	
Profilo	Convesso	
	Piatto	
Superficie	Lucida ruvida con smerigliature con presenza di puntini	
Colore	color crema, giallo chiaro	Filtro bianco
	bianco lattiginoso	Terreno agar nero

Figura 7 Caratteristiche morfologiche delle colonie del genere *Legionella*.¹⁶

Le colonie identificate nella fase di lettura delle piastre che vengono definite presunte, proprio a causa della grande variabilità di colori e forme che li caratterizzano. Per confermare tali colonie si utilizzano due terreni: il terreno BCYE agar e il terreno BCYE – cys. Il terreno BCYE-cys, rispetto il primo, è privo di L-cisteina. Quest'ultimo è un amminoacido che, se assente, crea inibizione nella crescita delle colonie del genere *Legionella*. Mediante delle anse sterili viene prelevata almeno delle colonie

presunte delle quali si sta effettuando la conferma e si trasferiscono prima sul terreno BCYE-cys e poi sul terreno BCYE agar. Se sono presenti colonie aventi morfologie diverse, allora la conferma si deve effettuare su ognuna di queste selezionandone, se presenti, 3. Invece, se è presente un solo tipo di colonia, se ne selezionano 5. I terreni di conferma vengono incubati a (36 ± 2) °C per 2 giorni. Se le colonie del genere *Legionella* si moltiplicano sul terreno BCYE e non sul BCYE-cys, allora le colonie vengono confermate come colonie del genere *Legionella*. Se il risultato è dubbio si prolunga il tempo di incubazione e si prosegue con lo step finale del processo analitico, ovvero l'identificazione sierologica mediante il test di agglutinazione al lattice (Latex test) (Figura 8),¹⁶ che utilizza sfere di lattice con antigeni specifici dell'agente patogeno di interesse.⁸

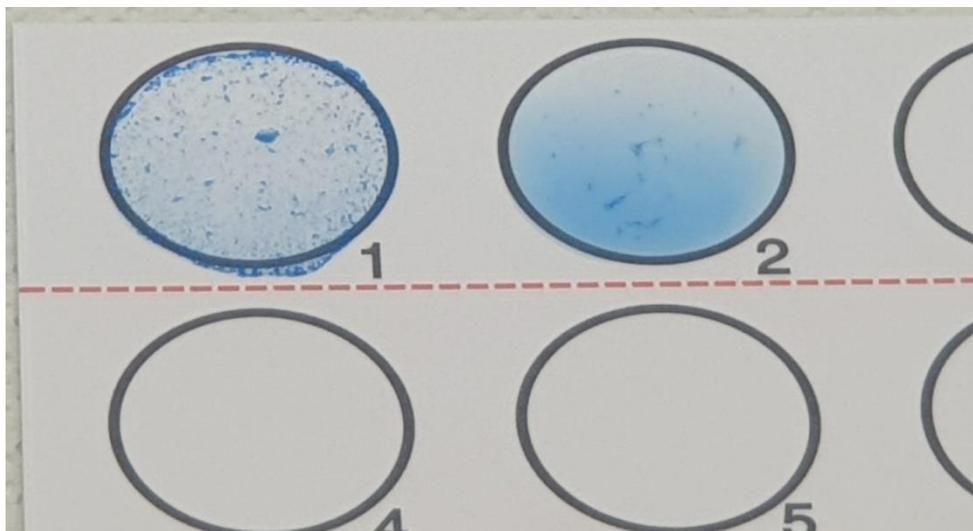


Figura 8 Latex test. a) Nel cerchio numero 1 il liquido si è agglutinato;
b) Nel cerchio numero 2 il liquido non risulta agglutinato.

Nel caso in cui il risultato sia ancora incerto dopo aver effettuato l'identificazione sierologica, si può procedere con il test immunocromatografico oppure qualsiasi altro metodo che consenta di confermare o escludere la presenza di *Legionella*, mediante l'uso dei kit che sono facilmente reperibili in commercio, come ad esempio quello di immunofluorescenza diretta o indiretta.¹⁴

Al fine di evitare contaminazioni la procedura analitica viene effettuato sotto cappa a flusso laminare di classe II. Inoltre, si attua una sterilizzazione preventiva di tutto il materiale utilizzato ovvero le rampe di filtrazione, il tampone acido, la soluzione Ringer e le pinzette, facendo particolare attenzione a quest'ultime che devono essere sterilizzate ogni qual volta vengano usate per lo spostamento del filtro dalla rampa alla capsula Petri contenente il terreno. In ultima, è necessario avvinare le pipette qual ora si usassero per il prelievo del campione da sottoporre alla filtrazione. Per la sicurezza del

personale tecnico operante, è indispensabile l'utilizzo dei dispositivi di protezione individuale adeguati al tipo di analisi che si sta effettuando, come il camice e i guanti.¹⁶

2.4. Elaborazione ed espressione dei dati

I dati raccolti in seguito alla lettura delle piastre vengono elaborati tramite un software chiamato LIMS (Laboratory Information Management System) e vengono espressi seguendo le informazioni presenti nella ISO 11731:2017. Il software calcola automaticamente le concentrazioni, espresse in unità formanti colonia su litro (UFC/l).^{12,16}

Inizialmente viene effettuato il calcolo del numero di colonie di *Legionella* confermata (a), mediante la seguente formula (Formula 1).^{12,16}

$$a = \frac{\text{numero di colonie confermate}}{\text{numero totale di colonie sottoposte a conferma}} \times \text{numero totale di colonie presunte}$$

*Formula 1*¹²

Per il metodo “filtrazione e deposito della membrana”, “a” può assumere valori compresi tra 1 e 100.^{12,16}

La concentrazione di *Legionella* (Cs) si calcola tenendo conto sia del parametro a, sia del volume totale del campione testato (Vtot) e sia del volume di riferimento scelto per esprimere la concentrazione dei microrganismi nel campione (Vs), che equivale a 1000 ml (Formula 2).

$$Cs = \frac{a}{V_{tot}} \times Vs = \frac{a}{V_{tot}} \times 1000$$

*Formula 2*¹²

Nel caso in cui vi siano più piastre ottenute con la stessa procedura, cioè con lo stesso terreno e la stessa tecnica, la concentrazione di *Legionella* si ottiene effettuando la media pesata delle concentrazioni. Inoltre, si possono escludere dal calcolo le piastre nelle quali sono presenti microrganismi interferenti che appunto, interferiscono, nella lettura di tali piastre.^{12,16}

Il software LIMS rielabora automaticamente i dati inseriti e li esprime seguendo alcune regole specifiche. L'espressione dei risultati, infatti, si basa sui limiti di rilevabilità inferiori e superiori delle concentrazioni (Tabella 6). Per i campioni prelevati da strutture ricettive il limite inferiore è 100 UFC/l e quello superiore è 10000 UFC/l. Invece, per i campioni prelevati da strutture sanitarie il limite inferiore è 10 UFC/l e quello superiore è 10000 UFC/l. In ultima, tutti i valori compresi tra i limiti di rilevabilità vengono arrotondati alla seconda cifra significativa.^{12,16}

Infine, è stato effettuato il calcolo dell'incidenza e della distribuzione in base ai sierotipi e alle utenze (lavandino, doccia, bidet, vasca). Quest'ultimi risultati vengono poi confrontati e valutati rispetto le fasce di cambio intervallo descritti nella Figura 2 e nella Figura 3 (vedi paragrafo 1.3.1).

3. Risultati e discussione

Dal grafico 1 si può vedere come i campioni in esame sono costituiti dal 43.42% di campioni prelevati in strutture ricettive e dal 56.58% da campioni prelevati in strutture sanitarie.



Grafico 1 Distribuzione dei campioni totali prelevati per tipo di struttura.

Per ogni struttura poi vi è un'ulteriore divisione. Infatti, il Grafico 2 rappresenta la distribuzione dei campioni che sono risultati positivi e negativi per ogni struttura. Dal grafico si può chiaramente vedere come le percentuali di positivi, e di conseguenza anche i negativi, non si discostino in modo accentuato. Ciò vuol dire che, rispetto ai campioni in esame, la percentuale di campioni positivi risulta avere un valore simile sia per i campioni delle strutture sanitarie che per quelli delle strutture ricettive. La concentrazione di *Legionella*, quindi, non dipende dal tipo di struttura in esame.

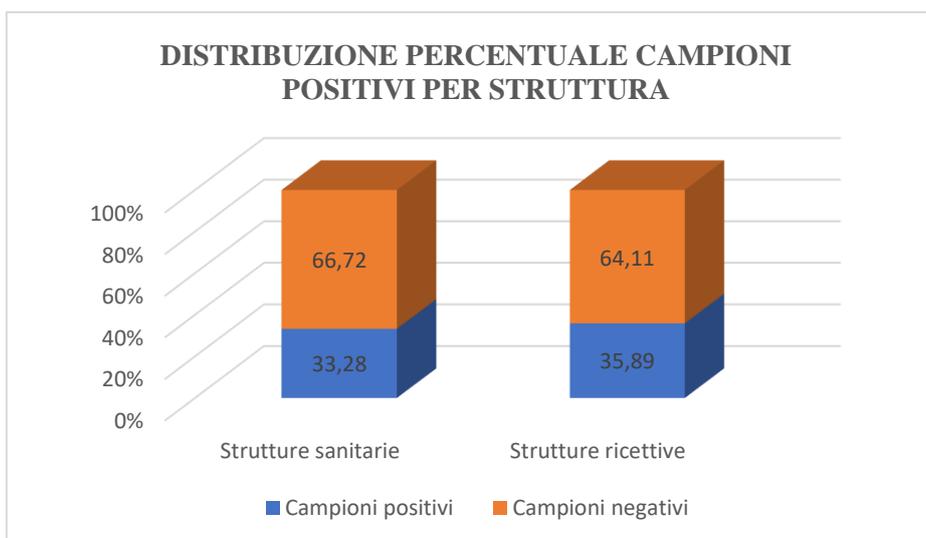


Grafico 2 Grafico a colonne rappresentante la distribuzione percentuale dei campioni positivi per tipo di struttura.

I campioni sono stati ulteriormente analizzati rispetto la fonte di prelievo, cioè se il prelievo sia avvenuto presso un'utenza o no. L'analisi è stata effettuata sia per la totalità dei campioni (Grafico 3), dove risulta che il 73.70% sia stato prelevato da un'utenza e il restante 26.30% da una fonte diversa. sia per i campioni delle strutture sanitarie (Grafico 4) e ricettive (Grafico 5).



Grafico 3 Distribuzione dei campioni positivi totali in base all'avvenuto campionamento ("Utenze") o meno ("Altro") da un'utenza.

Approfondendo l'analisi rispetto anche alla distribuzione per tipo di struttura, risulta che i campioni prelevati nelle strutture sanitarie sono per il 72.62% raccolti da un'utenza e per il 27.38% da una fonte diversa da quest'ultima (Grafico 4).

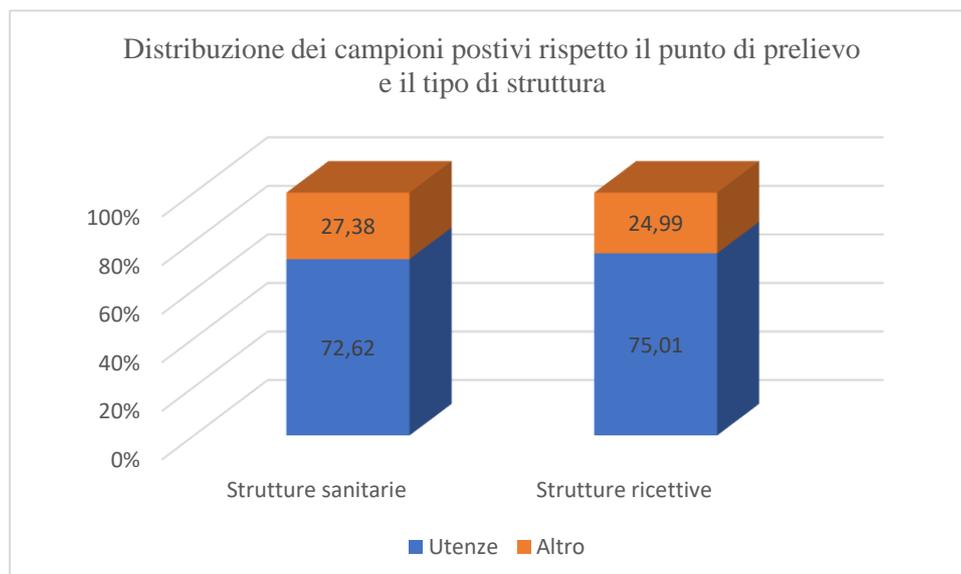


Grafico 4 Distribuzione campioni positivi in base all'avvenuto campionamento ("Utenze") o meno ("Altro") da un'utenza nelle strutture sanitarie e ricettive.

Le percentuali relative alle strutture ricettive non si discostano di molto da quest'ultime. Infatti, i campioni prelevati da tali strutture sono nel 75.01% dei casi raccolti presso un'utenza e, di conseguenza, nel 24.99% da una fonte diversa.

Continuando con l'analisi, è stata calcolata la distribuzione dei campioni totali rispetto le varie utenze, ovvero lavandino del bagno, lavandino della cucina, doccia, vasca e bidet. Il grafico 5 sottolinea che del 75.01% di campioni prelevati presso un'utenza (Grafico 4), il 60.93 % è stato raccolto da lavandini dei bagni, il 27.30% dalle docce, il 9.5% da lavandini delle cucine, l'1.38% da bidet e lo 0.83% da vasche da bagno.

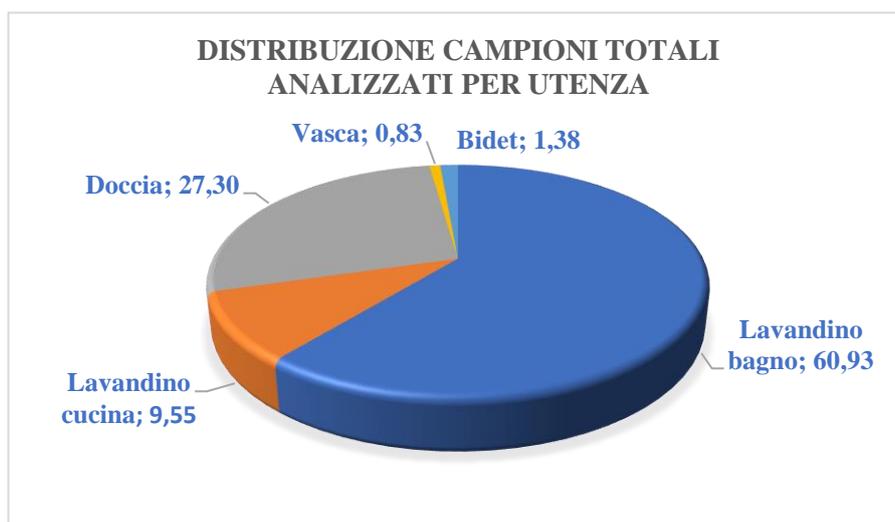


Grafico 5 Distribuzione dei campioni totali analizzati per tipo di utenza.

Tale distribuzione è stata effettuata anche per i campioni prelevati da strutture sanitarie che strutture ricettive (Grafico 6). Dal grafico si può facilmente capire come la maggior parte dei campioni prelevati dalle utenze vengono prelevati dai lavandini dei bagni, e quelli che vengono invece analizzati con minor frequenza sono i campioni prelevati dalle vasche e dai bidet. Infatti, la percentuale di campioni prelevati dai lavandini è del 66.95% per le strutture sanitarie e 52.95% nelle strutture ricettive. Tali valori si discostano notevolmente da quelli riferiti alle altre utenze, per entrambi i tipi di struttura. Ciò sta a significare che i lavandini dei bagni sono le utenze che vengono maggiormente analizzate, probabilmente perché spesso sono l'unica utenza presente nel punto di campionamento in esame. Le vasche e i bidet sono invece tra le utenze che vengono analizzate con minor frequenza probabilmente, in modo uguale ma opposto rispetto i lavandini dei bagni, perché sono le utenze che risultano essere meno presenti nei punti di campionamento.

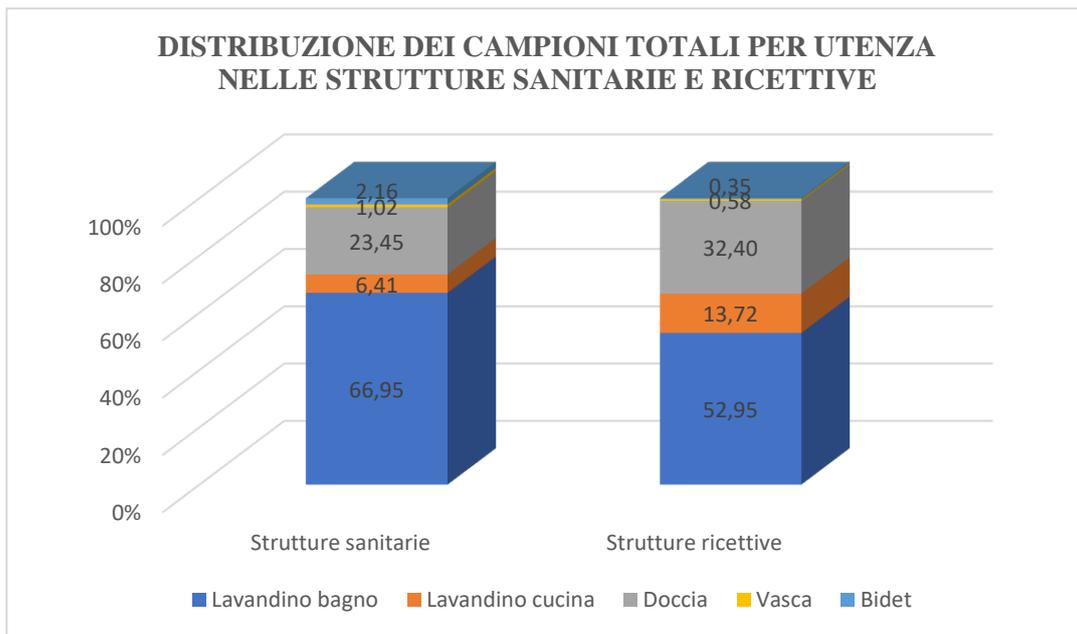


Grafico 6 Distribuzione dei campioni totale per utenza rispetto il tipo di struttura.

Effettuare un'analisi della distribuzione dei campioni positivi per utenza rispetto i campioni positivi totali darebbe come risultato una valutazione sbagliata. Risulterebbe infatti che la percentuale maggiore di campioni positivi riscontrati tra le utenze sia riferita ai lavandini dei bagni, ma ciò non è propriamente corretto. Infatti, in questo modo verrebbe valutata la corretta distribuzione dei campioni positivi solo in funzione del numero di campioni per tipo di utenza. Automaticamente, dal momento che il numero di campioni prelevati dai lavandini è maggiore rispetto la somma di tutti i campioni prelevati dalle altre utenze, allora di conseguenza risulterebbe maggiore anche il numero di campioni positivi associati ai lavandini dei bagni.

Per valutare la distribuzione corretta dei campioni positivi, quest'ultima è stata effettuata rispetto la singola utenza; ovvero, è stata calcolata la percentuale di campioni positivi e negativi per ogni utenza sia per strutture sanitarie (Grafico 7) che per le strutture ricettive (Grafico 8).

Dal Grafico 7 risulta evidente come l'unico tipo di utenza delle strutture sanitarie, nella quale è stata riscontrata una variazione nella distribuzione dei campioni positivi, è il bidet. Quest'ultima però non risulta essere un dato attendibile a causa del numero di campioni analizzati per tale utenza. In numeri assoluti, il numero di campioni prelevati presso i bidet, nell'intervallo di tempo in esame, è 138, di cui 123 campioni prelevati da strutture sanitarie e 15 campioni prelevati da strutture ricettive, rapportato il numero totale di campioni che sono 13790, di cui 9985 prelevati dalle utenze. Un così basso numero di campioni può causare errori di interpretazione dei dati. Le altre utenze, invece, sono caratterizzate da una distribuzione, tra loro, omogenea dei campioni che sono risultati positivi e

negativi. Infatti, la percentuale di campioni positivi si aggira intorno al 30% sia nei lavandini dei bagni, che in quelle delle cucine, che nelle docce e nelle vasche.

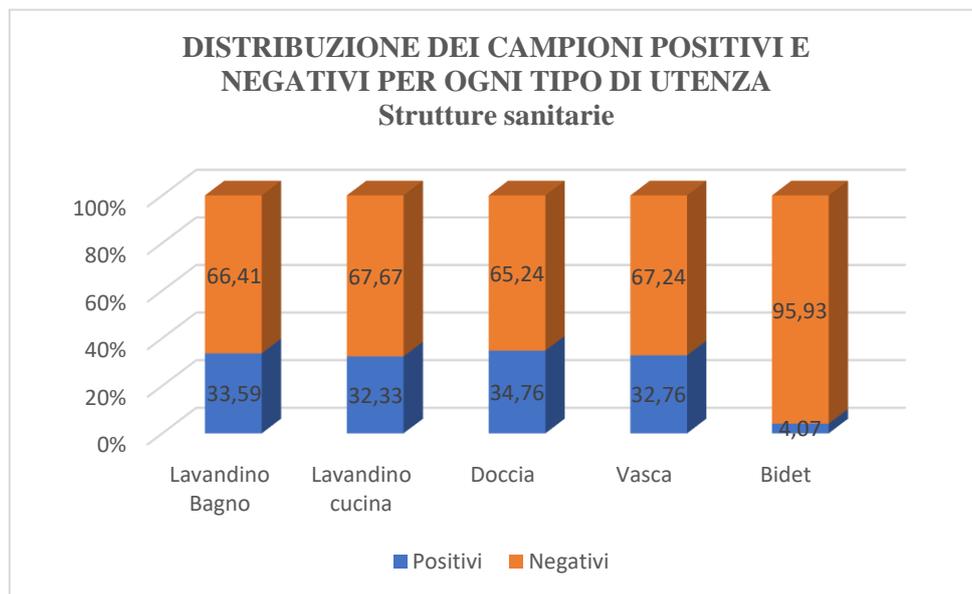


Grafico 7 Distribuzione dei campioni positivi e negativi rispetto ogni utenza dei campioni prelevati nelle strutture sanitarie.

Nel Grafico 8 invece vi è una distribuzione meno omogenea rispetto il grafico precedente. In questo caso, l'utenza nella quale è stato riscontrato una maggior concentrazione del batterio è il lavandino della cucina. Come nel Grafico 7, i dati relativi ai bidet non risultano essere attendibili. Anche se l'andamento non risulta essere omogeneo, non vi è nessun dato che si discosta in modo rilevante.

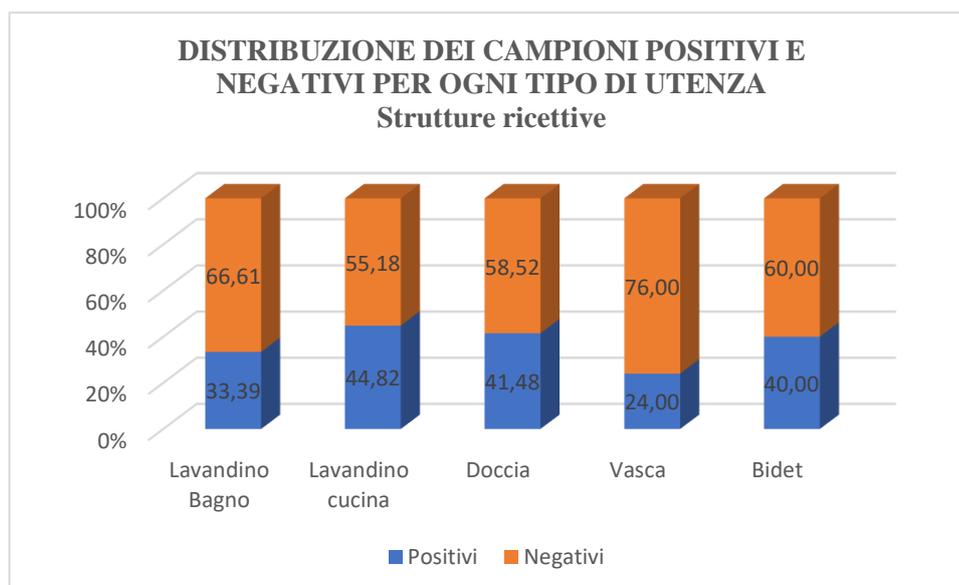


Grafico 8 Distribuzione dei campioni positivi e negativi rispetto ogni utenza dei campioni prelevati nelle strutture ricettive.

Dai tali grafici sembrerebbe trapelare che la concentrazione di campioni nei quali è stata riscontrata la presenza di *Legionella* sia dovuto in modo non troppo rilevante al tipo di utenza in esame nelle strutture sanitarie e in modo più significativo, sempre rispetto il tipo di utenza, nelle strutture ricettive. I campioni prelevati da altri punti di campionamento, differenti dalle utenze, sono nel 56.97% derivanti da strutture sanitarie e nel 43.03% da strutture ricettive (Grafico 9).

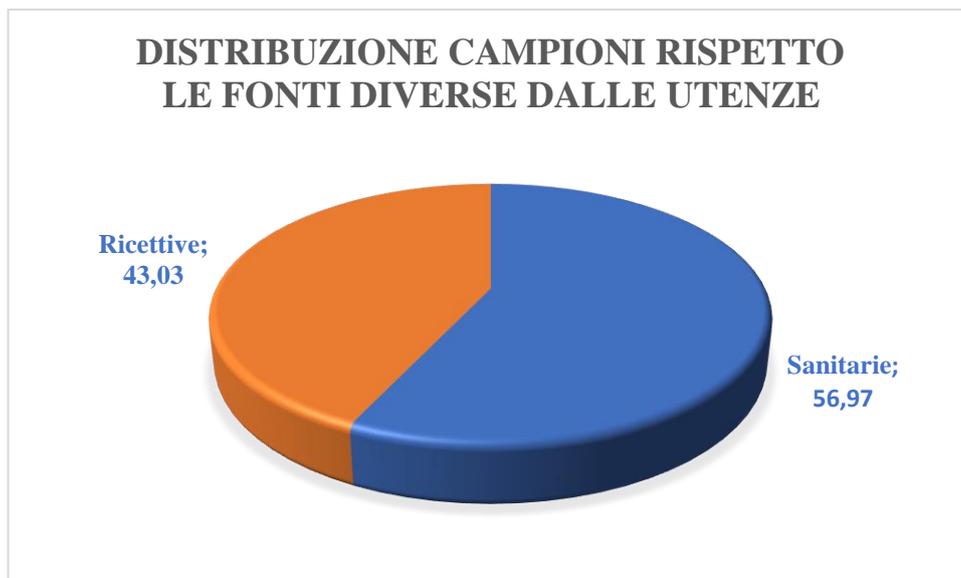


Grafico 9 Distribuzione dei campioni totali, campionati presso punti diversi dalle utenze.

Successivamente i campioni sono stati analizzati in base all'intervallo di intervento (vedi Figura 2 e Figura 3 Paragrafo 1.3.1). Nel grafico 10 è rappresentata la distribuzione dei campioni, prelevati da strutture sanitarie e ricettive, divisi rispetto l'intervallo di intervento al quale appartengono in base rispetto la concentrazione di *Legionella*.

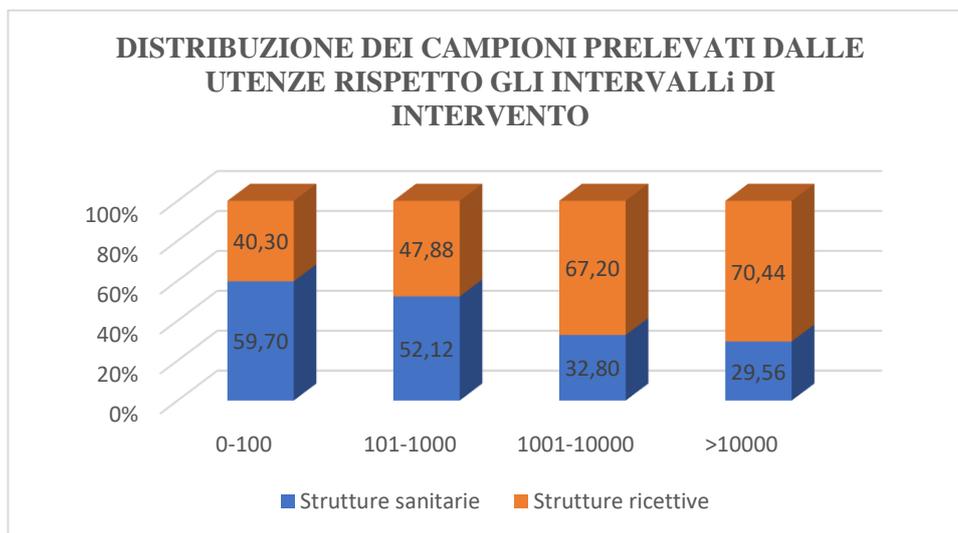


Grafico 10 Distribuzione dei campioni prelevati presso le utenze rispetto gli intervalli di intervento.

Da tale grafico si può vedere come la proporzione tra i campioni delle due strutture cambi notevolmente man mano che si passa da intervalli nei quali vi è una minore concentrazione di *Legionella* a intervalli in cui tale concentrazione è maggiore. Il grafico mostra chiaramente come vi è una prevalenza di campioni prelevati dalle strutture ricettive nelle quali è stata riscontrata un'elevata concentrazione del batterio. Anche in questo caso bisogna considerare però che il numero di campioni in termini assoluti per non incorrere in errori di valutazione. Il numero di campioni prelevati dalle utenze, per i quali è stata analizzata una concentrazione di *Legionella* maggiore di 10000 UFC/l, è 274, di cui 81 prelevati da strutture sanitarie e 193 prelevati da strutture ricettive. Il numero di quest'ultimi è più del doppio rispetto le strutture sanitarie ma rispetto il numero di campioni totale prelevato presso un'utenza, questo valore risulta meno significativo (1.93%).

Il Grafico 11 e il Grafico 12 sono gli ultimi grafici che trattano la relazione che vi è tra il tipo di struttura, il tipo di utenza e gli intervalli di intervento. Il primo considera tutti i campioni, il secondo solo i campioni risultati positivi. Quindi, l'unica cosa che differenzia i due grafici sono le colonne relative all'intervallo 0-100. Non vi è presente un'omogeneità dei dati e anche in questo caso, si possono trarre delle considerazioni già valutate nei grafici precedenti. I valori riferiti al bidet, per i

motivi sopracitati, non si considerano attendibili. Ciò viene, appunto, nuovamente confermato da tali grafici perché i dati riferiti all’utenza “bidet” risultano o assenti oppure risultano eccessivamente diversi rispetto gli altri, con una totale percentuale di presenza solo in una delle due strutture, ad esempio, come si può vedere nell’intervallo di intervento 1001-10000. Inoltre, In entrambi i grafici si può vedere che è presente un aumento della tendenza, riferita alle strutture ricettive, rapportato all’aumento della concentrazione del batterio negli intervalli di intervento.

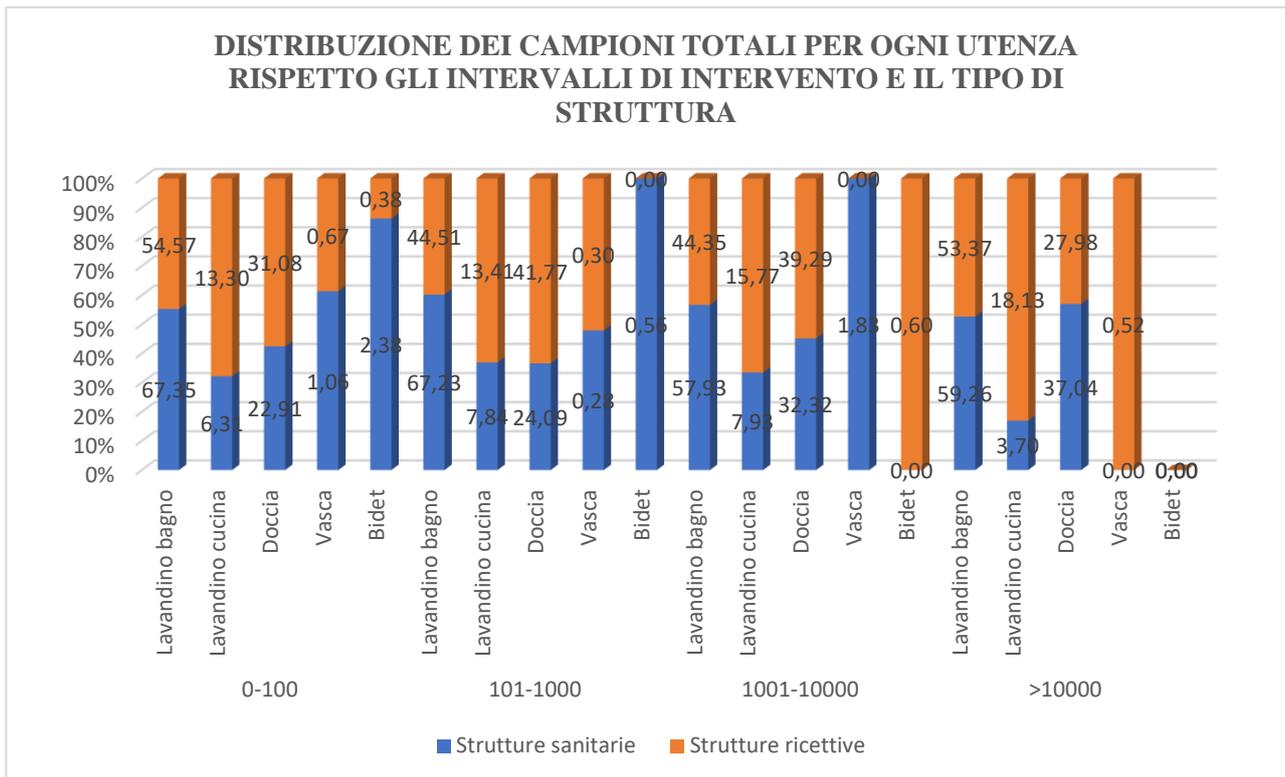


Grafico 11 Distribuzione dei campioni totali rispetto il tipo di utenza, gli intervalli di intervento e il tipo di struttura.

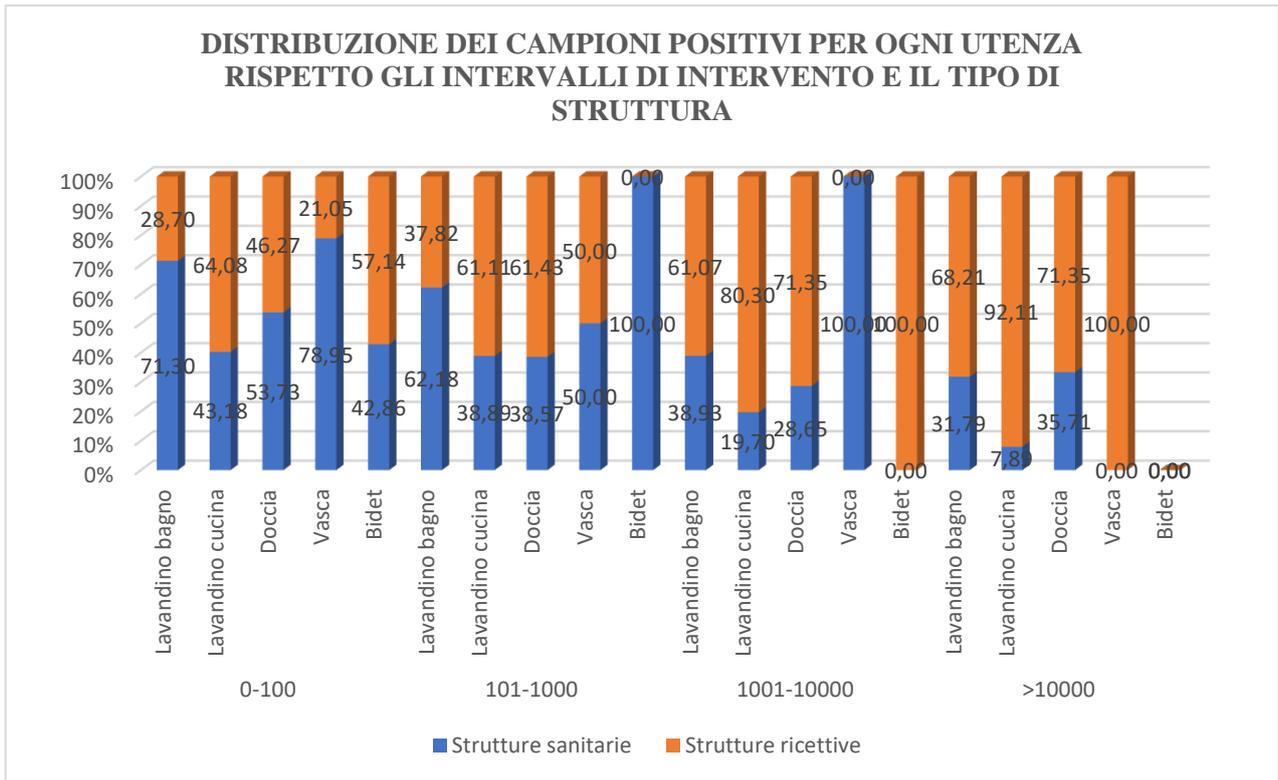


Grafico 12 Distribuzione dei campioni positivi rispetto il tipo di utenza, gli intervalli di intervento e il tipo di struttura.

In ultima, è stata effettuata un'analisi rispetto la distribuzione sierologica. Per legge, non è obbligatorio effettuare tale analisi. Infatti, come è rappresentato nel grafico 13, solo il 59.31% dei campioni positivi è stato sottoposto all'analisi dell'identificazione sierologica.

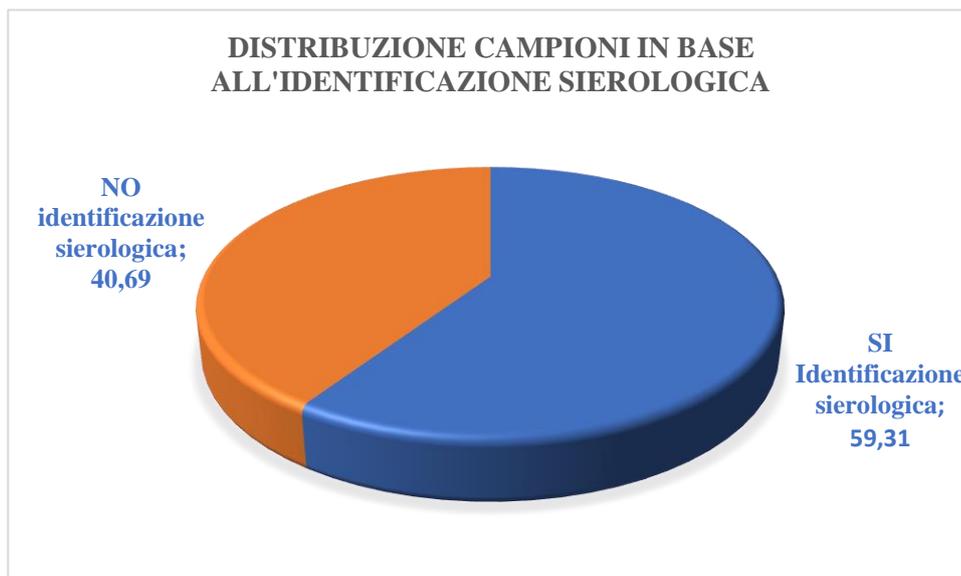


Grafico 13 Distribuzione dei campioni sottoposti all'identificazione sierologica con l'ausilio del Latex test.

Di questo 59.31 %, nella quasi totalità dei campioni (96.80%) è stata rilevata la presenza di un solo tipo di sierogruppo presente e in meno del 5% di tali campioni la presenza contemporanea di due o tre sierogruppi (Grafico 14).



Grafico 14 Distribuzione dei campioni sottoposti a identificazione sierologica rispetto la presenza singola o contemporanea di più sierotipi.

I sierogruppi che vengono analizzati sono chiamati SG1, 2-14 e spp. I primi due tipi sono sierogruppi appartenenti alla *Legionella pneumophila*, il terzo fa riferimento a sierogruppi di *Legionella* a livello di specie. Nel Grafico 15 è presente la distribuzione di tali sierotipi all'interno del 96.80% di campioni in cui quest'ultimi sono presenti singolarmente.



Grafico 15 Distribuzione dei tipi di sierogruppi nei campioni in cui vi è la loro presenza singolarmente.

In tale grafico viene sottolineato come il 56.96% di sierogruppi presenti sia quello 2-14, ed è quello presente in maggior misura nei casi in cui è presente singolarmente un tipo di sierogruppo. Segue con il 29.36% il sierogruppo SG1 e con il 14.68% spp. Tali valori sono diversi da quelli previsti, dal momento che il sierogruppo SG1 è quello che risulta generalmente più diffuso e maggiormente responsabile anche dell'espressione della malattia (vedi paragrafo 1.2.3); l'aspettativa iniziale, quindi, era di trovare quest'ultimo maggiormente presente nei campioni analizzati.

Infine, nel grafico 16, viene rappresentata la distribuzione di campioni, contenuti nel 3.13 % visto nel Grafico 14, di campioni nei quali sono presenti contemporaneamente due tipi di sierogruppi differenti. I sierogruppi presenti contemporaneamente per una maggiore percentuale sono 2-14 e spp per il 62.5% dei casi.



Grafico 16 Distribuzione delle coppie di sierogruppi presenti contemporaneamente.

Quindi, riassumendo, dai risultati non vi siano marcate differenza tra le strutture sanitarie e le strutture ricettive, sia in termini di campioni totali che in termini di campioni positivi (Grafico 1 e Grafico 2). Anche l'andamento delle distribuzioni rispetto le utenze risulta omogeneo, considerando il diverso numero di campioni prelevato per ogni tipo di utenza. Infatti, l'utenza "Lavandino Bagno" è quella maggiormente analizzata, spesso perché è l'unica presente.

La variabilità dei dati diventa più marcata nelle distribuzioni per intervallo di intervento. Infatti, dai risultati viene evidenziato chiaramente come i campioni nei quali è stata analizzata una concentrazione di *Legionella* compresa tra 1001 e 10000 unità formanti colonia su litro, oppure una concentrazione di *Legionella* maggiore di 10000 unità formanti colonia su litro, sono prevalentemente raccolti da strutture ricettive. Ciò può essere causato forse dalla maggior frequenza, per il quale

vengono effettuate le analisi nelle strutture sanitarie, che essendo luoghi che effettuano un servizio pubblico sono maggiormente tenuti sotto controllo rispetto le strutture ricettive. Bisogna però sempre considerare che il numero di campioni nei quali è stata riscontrata una così elevata concentrazione di Legionella sono in percentuale minima rispetto la percentuale totale di campioni.

Infine, l'analisi rispetto la distribuzione sierologica sottolinea come nella quasi totalità dei campioni sia presente un solo tipo di sierogruppo analizzato e di questa percentuale, più della metà è risultato essere il tipo 2-14 (Grafico 14 e Grafico 15).

Infine, è importante chiarire che in questo elaborato è stato deciso di non effettuare un'analisi rispetto la distribuzione dei campioni in riferimento alla località geografica di appartenenza perché non è stato considerato rilevante a causa della poca variabilità presente.

4. Conclusioni

I risultati, ampiamente trattati nel capitolo precedente, hanno sottolineato la presenza di alcune tendenze molto interessanti. Però, il campione totale considerato, per quanto sia numeroso, non è caratterizzato da una variabilità tale da poter essere rilevante ai fini dell'analisi. Il problema, che è alla base di questa mancata variabilità, è dato dalla fonte di questi dati. Infatti, quest'ultimi derivano dalle analisi effettuate da giugno 2019 a fine dicembre 2022 in un unico laboratorio, il quale effettua analisi su specifica richiesta, con una determinata operatività e dagli stessi tecnici specializzati.

Per far sì che tale l'analisi risulti valida, bisognerebbe ampliarla, considerando i dati derivanti da altri laboratori, che quindi includono indicativamente anche un diverso tipo di clientela, delle condizioni operative potenzialmente diverse, dei tecnici che effettuano la procedura analitica diversi, dei materiali e delle sostanze derivanti da un fornitore diverso. In questo modo si otterrebbe un campione di analisi più vario sia in termini di fonti che in termini di luogo geografico di prelievo, e quindi, di conseguenza, oltre che all'analisi qui parzialmente effettuata, si renderebbe rilevante anche l'analisi rispetto la distribuzione geografica dei campioni positivi, indispensabile per avere una valutazione completa.

La *Legionella* è un batterio che è notevolmente sconosciuto anche se, essendo un organismo ubiquitario, l'uomo e quest'ultimo convivono costantemente. Per questo motivo è importante maturare una certa conoscenza rispetto l'argomento così da non sottovalutarlo, né tantomeno sopravvalutarlo. Dal momento che la *Legionella* può causare, in determinate condizioni, l'espressione di una malattia potenzialmente mortale, è necessario cercare di prevenire, ed eventualmente attuare le migliori azioni correttive possibili, il proliferarsi del batterio oltre una soglia tale per la quale la salute dell'uomo risulta essere a rischio. L'evoluzione e la validazione di questo tipo di analisi è molto importante proprio per assumere una certa conoscenza sempre maggiore rispetto il "comportamento" di tali organismi, proprio per mettere in atto maggiori risorse per la minimizzazione dei problemi legati all'uomo.

5. Bibliografia e sitografia

- 1) Bella, A. – Blasior, P. – Girolamo, A. – Mupo, M. –Poznanski, E. – Prast, A. – Ricci, M.L. – Romanin, E. – Rota, M.C. –Scaturro, M. –Seeber, M. - Stenico, A (2020), *Evaluation of GVPC and BCYE Media for Legionella Detection and Enumeration in Water Samples by ISO 11731: Does Plating on BCYE Medium Really Improve Yield?*, MDPI.
- 2) Bella, A. - Caporali, M.G. – Giannitelli, S. – Ricci, M.L. - Rota, M.C. – Scaturro, M. (2021), *I risultati del sistema di sorveglianza della legionellosi nel 2021*. Istituto Superiore di Sanità (ISS) – EpiCentro: L'epidemiologia per la sanità pubblica.
- 3) Bender, Kelly S. – Buckley, Daniel H. – Madigan, Michael T. – Martinko, John M. –Stahl, David A. (2016). *Brock, Biologia dei microrganismi*.
- 4) Cottarelli, A. – De giusti, M. - Marinelli, L. – Solimini, A.G. (2014), *Factors influencing Persistence of Legionella pneumophila serogroup 1 in laboratory cocultures*, BMC Microbiology.
- 5) De Vincenzo, M. - Fusconetti, V. – Lucentini, L. - Marchiafava, C. – Mattei, D. – Nigro Di Gregorio, F., *Acqua e salute: un fragile equilibrio minacciato dagli effetti dei cambiamenti ambientali e climatici*. Dipartimento di Ambiente e Salute, ISS.
- 6) Dipartimento di Ambiente e Salute, ISS.
- 7) Griffiths, J.K. (2008), *Waterborne Disease*, International Encyclopedia of Public Health.
- 8) Howanitz and Howanitz, *Laboratory Medicine*. Pubblicato da Church Livingston; 1991: pp 825–828.
- 9) <https://www.epicentro.iss.it/legionellosi/>.
- 10) <https://www.microbiologiaitalia.it/batteriologia/legionella-pneumophila/>
- 11) <https://www.salute.gov.it>
- 12) ISO 11731 (2017), *Water quality – Enumeration of Legionella*. Seconda edizione.
- 13) ISO 19458 (2007), *Water quality – Sampling for microbiological analysis*. Seconda edizione.
- 14) Linee guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi (2015).
- 15) PCR laboratori SRL.
- 16) PCR laboratori SRL, Istruzione tecnica, *Conta di Legionella - ISO 11731*.