



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione

Corso di Laurea magistrale in Biotecnologie per l'alimentazione

Trattamento acido e termico nella ricerca del batterio *Legionella*
secondo il metodo ISO 11731:2017: confronto dei risultati
ottenuti in campioni di acqua ad uso umano

Relatore:

Prof.ssa Barbara Cardazzo

Correlatore:

Dott.ssa Pamela Gurlini

Laureanda

Ilenia Lampis

Matricola n.:

2057927

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

RIASSUNTO

La Legionella è un batterio gram-negativo aerobio di cui sono state identificate più di 60 specie suddivise in circa 70 sierotipi. Tra le specie identificate, quella più pericolosa e responsabile del 90% dei casi di legionellosi è la *Legionella pneumophila*.

L'oggetto del presente lavoro di tesi è lo studio della *Legionella spp.* presente nelle acque idrosanitarie attraverso il metodo ISO 11731:2017; nello specifico sono stati presi in considerazione cento campioni di acqua prelevati in luoghi differenti e poi analizzati tramite la filtrazione e la posa diretta della membrana su piastra.

La procedura prevede che questi campioni vengano esaminati tal quali (NT) e dopo trattamento sia termico (TT), alla temperatura di 50°C, che acido (TA), utilizzando una soluzione acida HCl-KCl. Nel caso in esame, su 100 campioni analizzati solo 26 si sono rivelati utili al fine del confronto.

I dati sono stati infine rielaborati (avvalendosi del software Excel) sia analizzando - alla luce dei risultati ottenuti - le diverse tipologie dei campioni analizzati (grafici a torta) che con l'utilizzo di appositi test statistici (test t di Student a due code per dati appaiati, coefficiente di correlazione r di Pearson, regressione lineare) per valutare se le differenze riscontrate fossero o meno significative.

In termini di risultato, lo studio condotto ha evidenziato che confrontando NT e TA si ottengono risultati statisticamente uguali, mentre comparando NT con TT e TT con TA abbiamo esiti statisticamente diversi.

ABSTRACT

Legionella is an aerobic gram-negative bacterium of which more than 60 species have been identified and divided into approximately 70 serotypes. Among the species identified, the most dangerous and the one responsible for 90% of cases of legionellosis is Legionella pneumophila.

The object of this thesis is to study Legionella spp. present in sanitary waters through the ISO 11731:2017 method; specifically, one hundred water samples taken, in different places, were considered and then analyzed through filtration and direct placement of the membrane on the plate.

The procedure requires that these samples are examined as they are (NT), after both heat (TT) treatment, at a temperature of 50°C, and acid (TA), using an HCl-KCl acid solution. In the case in question, out of 100 samples analyzed only 26 proved useful for comparison purposes.

The data was finally reprocessed (using Excel software) both by analyzing - in light of the results obtained - the different types of samples analyzed (pie charts) and with the use of specific statistical tests (two-tailed Student's t test for paired data, Pearson's r correlation coefficient, linear regression) to evaluate whether the differences found were significant or not.

In terms of results, the study conducted, highlighted that by comparing NT and TA statistically equal results are obtained, while by comparing NT with TT and TT with TA we have statistically different outcomes.

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 La Legionella.....	1
1.1.1 Ecologia.....	5
1.1.2 Biofilm	6
1.1.3 Patogenesi, sintomatologia, diagnosi e terapia	8
1.2 Aspetti epidemiologici	11
1.2.1 Fattori di rischio e possibili esposizioni.....	12
1.2.2 Infezioni nosocomiali.....	15
1.2.3 Durata del ricovero ed esito della malattia.....	16
1.2.4 Cluster	17
1.3 Prevenzione	18
1.3.1 Valutazione del rischio.....	19
1.3.2 Gestione del rischio.....	20
1.3.3 Misure di prevenzione e azioni correttive	24
1.3.4 Monitoraggio	26
2. SCOPO DELLA TESI.....	27
3. MATERIALI E METODI	28
3.1 Campionamento	28
3.1.1 Materiale occorrente per il campionamento.....	29
3.1.2 Modalità di prelievo	30
3.1.3 Campionamento negli impianti idrosanitari	31
3.1.4 Campionamento nelle strutture turistico-ricettive	31
3.2 Trasporto e conservazione	32
3.3 Metodo utilizzato	33
3.3.1 Strumentazione.....	34
3.3.2 Terreni e reattivi.....	35
3.3.3 Procedura analitica.....	36
3.3.4 Espressione dei risultati.....	40
3.3.5 Test statistici utilizzati:	40
4. RISULTATI E DISCUSSIONI.....	45

4.1	Confronto strutture di origine.....	47
4.2	Confronto acqua calda e fredda	47
4.3	Confronto tipologia campioni	48
4.4	Confronto sierotipi.....	49
4.5	Confronto tra NT TT e TA.....	50
4.5.1	Confronto NT e TT	52
4.5.2	Confronto NT e TA.....	54
4.5.3	Confronto TA e TT	56
5.	CONCLUSIONI	61
6.	BIBLIOGRAFIA.....	62

1. INTRODUZIONE

1.1 La Legionella

Il genere *Legionella* è stato scoperto dal microbiologo del Centers for Disease Control (CDC), Joseph McDade, in seguito ad un'epidemia acuta che aveva colpito i partecipanti della American Legion al Bellevue Stratford Hotel di Philadelphia nel 1976. Solo in seguito si scoprì che il batterio si era riprodotto nell'acqua di una torre di raffreddamento del sistema di climatizzazione dell'Hotel Bellevue-Stratford. Molto probabilmente, i frequentatori della convention, avevano inalato piccole gocce di acqua contaminata da *Legionella*, situazione che provocò la malattia nei soggetti più anziani, negli immunodepressi oppure suscettibili per altre cause. Questa forma di polmonite precedentemente non conosciuta contagiò 221 persone e in 34 di esse provocò mortalità.

In Italia, il primo focolaio epidemico si verificò in un albergo sul Lago di Garda nel luglio 1978.

La *Legionella* essendo un batterio aerobio, per sopravvivere e svolgere le sue funzioni vitali necessita di ossigeno. Essa è un batterio Gram negativo e mobile, per cui, grazie alla presenza di flagelli sulla superficie esterna riesce a muoversi nell'ambiente circostante; inoltre, ha una forma sottile ed allungata di tipo bastoncellare, con un diametro che va dai 0,3 ai 0,9 micron e una lunghezza compresa tra 2 e 20 µm. La parete di questi microorganismi è caratterizzata dalla presenza di acidi grassi a catena ramificata, non presenti di solito nei Gram-negativi. Tale batterio appartiene all'ordine tassonomico delle *Legionellales*, che include la famiglia delle *Coxiellaceae* e *Legionellaceae*. La famiglia delle *Legionellaceae* è costituita da un unico genere *Legionella spp.*, di cui sono descritte 61 specie/sottospecie suddivise in 70 sierogruppi. Il 20% delle specie appena citate sono causa di malattia per l'uomo ma la specie patogena più frequente e causa di malattia per l'uomo è la *Legionella pneumophila* che è costituita da 16 sierogruppi. Altre sette specie contengono 2 sierogruppi e le restanti specie contengono un sierogruppo soltanto.

La *Legionella* responsabile dell'epidemia di Philadelphia, del 95% delle infezioni in Europa e dell'85% nel mondo è di fatto la *Legionella pneumophila sierogruppo 1*. (Edelstein & Roy, 2014).

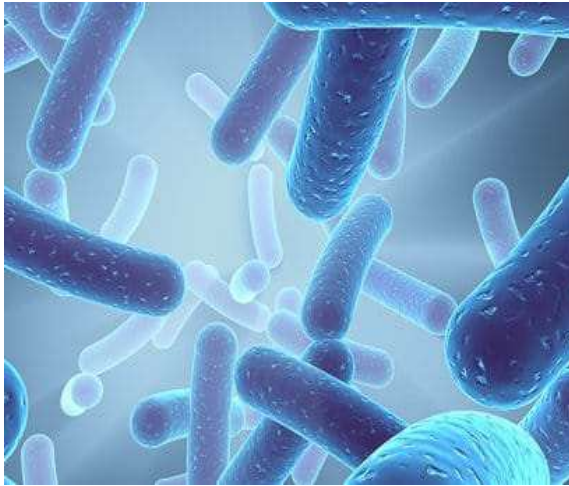


Figura 1: batteri di *Legionella* al microscopio

Domini o	Prokaryota
Regno	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	Gamma Proteobacteria
Ordine	Legionellales
Famigli a	Legionellaceae
Genere	<i>Legionella</i>

Tabella 1: filogenesi del genere *Legionella*

Legionella species	sierogruppi
1. <i>L. adelaidensis</i>	
2. <i>L. anisa</i>	
3. <i>L. beliardensis</i>	
4. <i>L. birminghamensis</i>	
5. <i>L. bozemanii</i>	2
6. <i>L. brunenti</i>	
7. <i>L. busanensis</i>	
8. <i>L. cardiaca</i>	
9. <i>L. cherrii</i>	
10. <i>L. cincinnatiensis</i>	
11. <i>L. drancourtii</i>	
12. <i>L. dresdenensis</i>	
13. <i>L. drozanskii</i>	
14. <i>L. dumoffii</i>	
15. <i>L. erythra</i>	2
16. <i>L. fairfieldensis</i>	
17. <i>L. fallonii</i>	
18. <i>L. feeleeii</i>	
19. <i>L. geestiana</i>	
20. <i>L. gormanii</i>	
21. <i>L. gratiana</i>	
22. <i>L. gresilensis</i>	
23. <i>L. hackeliae</i>	2
24. <i>L. impletisoli</i>	
25. <i>L. israelensis</i>	
26. <i>L. jamestowniensis</i>	
27. <i>L. jordanis</i>	
28. <i>L. lansingensis</i>	

29. <i>L. londiniensis</i>	2
30. <i>L. longbeachae</i>	2
31. <i>L. lytica</i> (comb. nov.)	
32. <i>L. maceachernii</i>	
33. <i>L. maceachernii</i>	
34. <i>L. micdadei</i>	
35. <i>L. moravica</i>	
36. <i>L. nagasakiensis</i>	
37. <i>L. nautarum</i>	
38. <i>L. oakridgensis</i>	
39. <i>L. parisiensis</i>	
40. <i>L. pittsburghensis</i>	
41. <i>L. pneumophila</i>	16
42. <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	
43. <i>L. pneumophila</i> subsp. <i>pascullei</i>	
44. <i>L. Pneumophila</i> subsp. <i>pneumophila</i>	
45. <i>L. quateirensis</i>	
46. <i>L. quateirensis</i>	2
47. <i>L. rowbothamii</i>	
48. <i>L. rubrilucens</i>	
49. <i>L. sainthelensi</i>	2
50. <i>L. sainthelensi</i>	
51. <i>L. shakespearei</i>	
52. <i>L. spiritensis</i>	2
53. <i>L. steelei</i>	
54. <i>L. steigerwaltii</i>	
55. <i>L. taurinensis</i>	

56. <i>L. tunisiensis</i>	
57. <i>L. tusconensis</i>	
58. <i>L. wadsworthii</i>	
59. <i>L. waltersii</i>	
60. <i>L. worsleiensis</i>	
61. <i>L. yabuuchiae</i>	

Tabella 2: elenco delle varie specie di *Legionella*

1.1.1 Ecologia

La *Legionella* è un batterio ubiquitario, acquatico presente in natura come laghi, fiumi, sorgenti termali, acque sorgive, stagni e paludi e ha una propensione a crescere in acqua calda, in particolare nelle torri di raffreddamento, negli scaldabagni e negli impianti idraulici di acqua potabile ma si è rilevata la sua presenza anche nel compost e nel suolo. Il patogeno in questione è acido-tollerante e ha una capacità di persistenza e proliferazione notevole. Nonostante si riproduca tra i 25 °C e 45 °C, con una temperatura ottimale compresa tra i 32°C e i 42°C, trattandosi di un batterio termofilo, mostra notevole resistenza alle alte temperature, infatti per un breve periodo è in grado di sopravvivere anche a temperature tra 5°C e 60 °C, dove sotto i 20°C i batteri sopravvivono ma si moltiplicano molto lentamente, a 50° possono continuare a sopravvivere per diverse ore e a 60°C muoiono in pochi minuti. Inoltre, sopravvive a pH tra 5,5 e 8,1 con un pH ottimale intorno a 7 che corrisponde al pH dell'acqua potabile, quindi riesce a sopravvivere in ambienti acidi e alcalini. Di conseguenza, questo batterio è perfettamente adattato alle caratteristiche della nostra temperatura e dell'acqua che utilizziamo.

La *Legionella* ha la caratteristica di essere in grado di colonizzare gli impianti idrici, ovvero dagli ambienti naturali, riesce a risalire e portarsi verso gli impianti artificiali, tra cui impianti di umidificazione, piscine, reti idriche cittadine, impianti idrici dei singoli edifici e fontane. Il batterio *Legionella* non si trova da solo nelle acque ma grazie alla presenza di protozoi, amebe, ciliati, alghe verdi e biofilm batterici mostra capacità di parassitismo, utilizzando gli ospiti come mezzo di diffusione e protezione da agenti esterni.

1.1.2 Biofilm

Il biofilm è costituito da una pellicola di microrganismi come batteri, protozoi, virus, miceti, ecc. presente sia in ambienti naturali che artificiali. Questa struttura consente ai microorganismi di resistere alle condizioni più avverse. Molti microrganismi, come *L. pneumophila*, in condizioni di temperature avverse e in presenza di pochi nutrienti utili per la crescita, per sopravvivere nell'ambiente aderiscono alle superfici e formano biofilm. Il flusso dell'acqua favorisce il trasporto di nutrienti portando così alla maturazione del biofilm stesso e la colonizzazione di diverse zone del sistema; le forze di taglio esercitate dai movimenti dell'acqua che scorre nelle tubature contribuiscono alla dispersione del biofilm. Questo processo amplifica i siti che favoriscono la crescita di microorganismi come *L. pneumophila*.

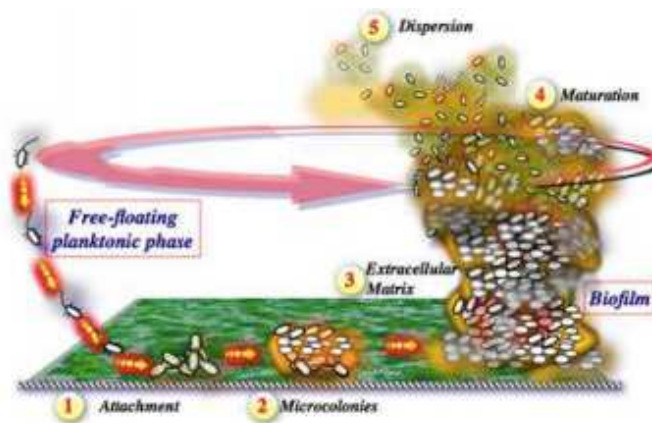


Figura 2: rappresentazione dei diversi stadi di formazione e sviluppo del biofilm

All'interno del biofilm, i microrganismi sono immersi in una matrice extracellulare che conferisce struttura, stabilità, nutrienti e protezione contro possibili effetti tossici dovuti al substrato su cui il biofilm cresce come nel caso dei tubi di rame presenti in alcuni sistemi di distribuzione d'acqua. La presenza del biofilm spiega la crescita di *L. pneumophila* negli ambienti acquatici artificiali, sottolineando l'importanza di prevenire la sua formazione, poiché una volta presente, risulta difficile da eliminare. Nell'ambiente artificiale i fattori che possono favorire la formazione del biofilm e, di conseguenza, la proliferazione di *Legionella* negli impianti idrici sono:

- la presenza di nutrienti nella risorsa idrica e i materiali di cui è composto il sistema idrico;
- le incrostazioni e le corrosioni delle tubature;
- le temperature dell'acqua;

- l'impianto termico centralizzato composto da una rete idrica estesa con presenza di giunture e rami morti;
- la presenza di sistema di raccolta e ricircolo dell'acqua vibrazioni o cambiamenti di pressione nel sistema idrico dovuti ad interventi di ristrutturazione interni o esterni all'edificio;
- l'acqua stagnante o con flusso lento come si verifica alla fine dei terminali di distribuzione o nei depositi di raccolta.

La presenza simultanea di biofilm e protozoi nel sistema ha un duplice effetto protettivo per i batteri, perché aumenta il carico organico e inattiva i livelli di disinfettante residuo. Inoltre, biofilm e batteri inclusa la *Legionella spp.* che si sviluppano all'interno di protozoi mostrano una maggior tolleranza al cloro e ad altri agenti antimicrobici.

Alcuni materiali contenenti piombo possono favorire o addirittura potenziare la proliferazione dei microrganismi, compresa *Legionella spp.*. Sostanze naturali, come le guarnizioni in gomma, forniscono un substrato nutriente preferenziale per la colonizzazione microbica. Inoltre, anche le superfici dei sistemi di raccordo in rame, notoriamente resistenti alla colonizzazione, possono sostenere la crescita microbica una volta condizionate dal biofilm.

Le amebe a vita libera nelle acque supportano la crescita intracellulare e la sopravvivenza dei batteri della *Legionella*. L'interazione tra amebe e batteri della *Legionella* è stata studiata in modo più completo per la *Legionella pneumophila*, la quale è un parassita intracellulare facoltativo di diverse amebe. Il batterio si moltiplica molte migliaia di volte all'interno delle amebe. Di fronte a fattori ambientali avversi, come cambiamenti di pH, assenza di nutrienti o alterazioni della temperatura, le amebe infette da *Legionella* incistano, garantendo la sopravvivenza sia dell'ospite che del parassita fino a quando condizioni più favorevoli consentono l'incistamento. Sia nelle acque naturali che in quelle artificiali, le amebe infette da *Legionella* si trovano in consorzi di molti microrganismi diversi, che esistono tutti in un biofilm.

Oltre alla sopravvivenza intra-amebale, i batteri della *Legionella* possono entrare in uno stato metabolico definito "vitale ma non coltivabile", rendendoli difficili da recuperare dall'ambiente e resistenti ai biocidi. A causa di cambiamenti ambientali i batteri della *Legionella*, le amebe e altri i microrganismi si staccano costantemente dal biofilm passando allo stato planctonico, provocando il rilascio improvviso e

massiccio di batteri della *Legionella* nell'acqua circostante. Se quest'acqua viene poi aerosolizzata o aspirata, i batteri possono causare malattie in un ospite suscettibile. (Edelstein & Roy, 2014)

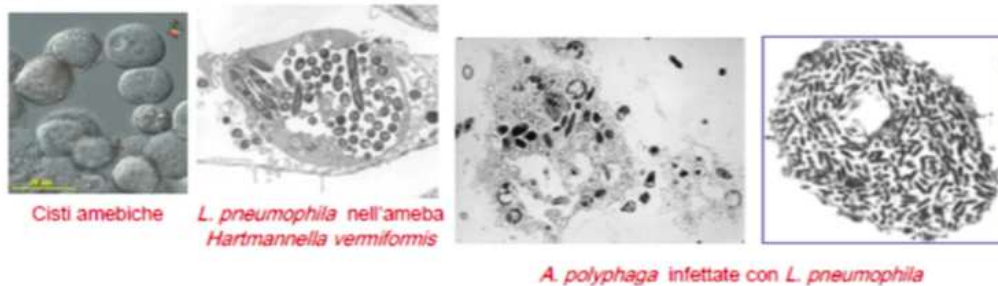


Figura 3: parassitismo da parte di *Legionella* nelle amebe

1.1.3 Patogenesi, sintomatologia, diagnosi e terapia

La Malattia del Legionario, più conosciuta con il nome di legionellosi, è un'infezione polmonare causata dal batterio Legionella.

L'infezione da *Legionella* si acquisisce tramite inalazione di aerosol contaminato o, meno comunemente, tramite aspirazione di acqua potabile. (Girolamini et al., 2020).

La pericolosità delle particelle d'acqua è inversamente proporzionale alla loro dimensione in quanto più le gocce di aerosol sono piccole, ossia sotto i 5µm di diametro, più sono pericolose per l'uomo poiché riescono a penetrare con più facilità le basse vie respiratorie.

I diversi fattori che determinano lo sviluppo e la tipologia della malattia sono:

1. la suscettibilità individuale dovuta a età avanzata, sesso in quanto gli uomini sono maggiormente soggetti a legionellosi, fumo, patologie pregresse degenerative, immunodeficienza; tutte queste caratteristiche determinano lo sviluppo della malattia del legionario, rispetto alla febbre di Pontiac.
2. variabili esterne come il grado di intensità dell'esposizione al batterio rappresentato dal tempo di esposizione e dalla quantità di *Legionella* presente in un certo volume di acqua. Inoltre, è importante anche la virulenza e la carica infettante dei singoli ceppi di *Legionella*, che, interagendo con la suscettibilità dell'ospite, determinano l'espressione clinica dell'infezione. Malgrado il carattere ubiquitario di *Legionella*, la malattia umana rimane rara; i tassi d'attacco nel corso di focolai epidemici sono bassi, inferiori al 5%.

La mortalità legata all'infezione da *Legionella* dipende da vari fattori, quali la gravità della malattia, l'efficacia del trattamento antibiotico iniziale, il luogo di contrazione dell'infezione, le condizioni pregresse del paziente e se la malattia è sporadica, nosocomiale o parte di un'epidemia. In termini generali, la letalità della legionellosi si colloca tra il 5% e il 10%. (Legionella Zero (2020). *ABC Legionella, strategie di controllo e prevenzione*)

Ci sono due forme distinte di legionellosi:

1. la Malattia del Legionario, una forma più acuta di polmonite;
2. la febbre Pontiac, una forma molto meno grave.

1. La **Malattia del Legionario** è una grave infezione che colpisce l'apparato respiratorio ed è causata dai batteri del gruppo *Legionella*, in modo particolare dalla specie *Legionella Pneumophila*. Tale malattia si manifesta come una polmonite infettiva, con o senza manifestazioni extrapolmonari con sintomi variabili tra tosse, febbre e dolore toracico. Nei casi gravi possono verificarsi bruscamente dispnea, cianosi e tosse produttiva mentre nei casi meno gravi i sintomi possono essere malessere, osteoartralgie e tosse lieve, non produttiva. A volte possono essere presenti sintomi gastrointestinali, neurologici e cardiaci; alterazioni dello stato mentale sono comuni. La malattia può comportare complicanze come ascesso polmonare, empiema, insufficienza respiratoria, shock, coagulazione intravasale disseminata, porpora trombocitopenica e insufficienza renale. Il periodo medio di incubazione della malattia del legionario è di 2-10 giorni, sebbene possa estendersi anche a più di 10 giorni. La malattia dei legionari è solitamente causata da *L. pneumophila*, ma in alcuni casi possono essere coinvolti anche uno o più organismi aggiuntivi, portando ad un'infezione mista. (www.epicentro.iss.it/legionellosi/)

2. La **febbre di Pontiac** è una malattia acuta, autolimitante, di breve durata, simil-influenzale senza polmonite cioè non polmonare con un periodo di incubazione di 24-48 ore. A differenza della malattia dei legionari, la febbre di Pontiac ha un alto tasso di attacchi, colpendo fino al 95% degli individui esposti. A differenza della LD, i bambini comunemente

contraggono la malattia. I sintomi sono: malessere generale, mialgie e cefalea, seguiti rapidamente da febbre, a volte con tosse e gola arrossata. Possono essere presenti diarrea, nausea e lievi sintomi neurologici quali vertigini o fotofobia. La maggior parte dei pazienti non ha bisogno assistenza medica e guarisce senza una terapia specifica da 3 a 5 giorni dopo l'esordio della malattia. (Edelstein & Roy, 2014)

Nel caso di pazienti che presentano i sintomi tipici dell'infezione da *Legionella*, è cruciale eseguire diagnosi cliniche, come la radiografia del torace e diagnosi di laboratorio.

I test per individuare un'infezione da *L. pneumophila* si eseguono quando si riscontrano batteri Gram-negativi nelle secrezioni delle vie respiratorie.

I metodi diagnostici per la legionellosi sono:

1. L'isolamento colturale;
2. Il rilevamento di anticorpi su siero;
3. Il rilevamento di antigene urinario;
4. L'utilizzo dell'immunofluorescenza per individuare il batterio nei tessuti e nei fluidi corporei;
5. L'amplificazione del DNA batterico tramite PCR.

La legionellosi è una malattia causata da batteri, pertanto il suo trattamento avviene principalmente attraverso terapie antibiotiche. La febbre di Pontiac mostra un decorso benigno anche senza trattamento specifico ma le altre malattie legate alla *Legionella species*, come le comuni polmoniti o le infezioni extrapolmonari (meno frequenti), richiedono terapie specifiche per ridurre il rischio di complicazioni gravi.

1.2 Aspetti epidemiologici

La legionellosi è soggetta a obbligo di notifica nella classe II (DM 15 dicembre 1990), ma dal 1983 è anche soggetta a un sistema di segnalazione che raccoglie informazioni dettagliate in un apposito registro nazionale, che ha sede presso l'Istituto superiore di sanità. Nonostante questo, secondo il Centro nazionale di Epidemiologia e il dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate dell'ISS, che annualmente producono un rapporto sull'incidenza della malattia nel nostro Paese, il numero di casi è sottostimato sia per un mancato invio delle schede di segnalazione da parte dei sistemi sanitari locali che per una mancata diagnosi. (Rota et al., 2023)

Nel corso del 2022, l'Istituto Superiore di Sanità ha ricevuto 3.111 schede di sorveglianza relative a casi di legionellosi. Di questi, 3.039 sono casi confermati mentre 72 sono considerati presunti.

Il 77% dei casi è stato segnalato dalle Regioni Lombardia, Emilia-Romagna, Toscana, Veneto, Lazio e Piemonte, mentre il rimanente 23% proviene dalle altre Regioni e Province Autonome.

L'incidenza della legionellosi in Italia, nel 2022 è stata di 51,9 casi per milione di abitanti, registrando un aumento del 14% rispetto all'anno precedente (46,0/1.000.000). Questo indica un ritorno ai livelli pre-pandemici come evidenziato in *Figura 4*. La maggioranza dei casi, oltre il 70%, coinvolge persone di almeno 60 anni con un'età media dei pazienti di 68 anni (DS = 14,4), considerando un intervallo compreso tra 0 e 100 anni. Per quanto riguarda il sesso, invece, il 68,1% dei casi riguarda individui di sesso maschile con un rapporto maschi/femmine pari a 2,2:1.

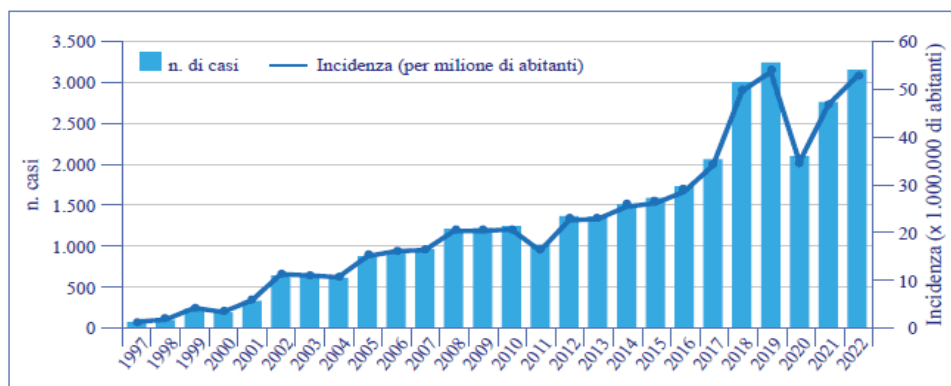


Figura 4: numero di casi e incidenza della legionellosi per anno

La *Tabella 3* riporta il numero di casi e il tasso di incidenza per classe d'età e sesso, evidenziando un aumento dell'incidenza con l'avanzare dell'età raggiungendo il picco di 169,7 casi per milione di abitanti nella fascia di età pari o superiore a ottanta anni.

Fascia di età	Maschi		Femmine		Totale	
	n. casi	Incidenza	n. casi	Incidenza	n. casi	Incidenza
0-19	3	0,9	0	0,0	3	0,4
20-29	21	6,3	1	0,3	22	3,6
30-39	58	17,0	13	3,9	71	10,5
40-49	189	43,7	50	11,5	239	27,6
50-59	416	87,3	130	26,2	546	56,3
60-69	493	136,6	177	45,0	670	88,7
70-79	518	186,2	269	82,7	787	130,9
80+	423	247,7	342	121,9	765	169,7
Totale	2.121	72,6	982	32,0	3.103 *	51,9

(*) Per 8 casi (7 maschi e 1 femmina) l'età non è nota

Tabella 3: numero di casi di legionellosi e incidenza per fascia d'età e sesso

1.2.1 Fattori di rischio e possibili esposizioni

Nel 17,5% dei soggetti si è verificata un'esposizione al rischio nei 10 giorni precedenti l'insorgenza dei sintomi. Tra i 3.111 casi segnalati, il 2,9%, ovvero 90 casi, è stato ricoverato in ospedale, il 2,9% ovvero 89 casi risiedeva in case di riposo per anziani, residenze sanitarie assistenziali (RSA) o strutture di riabilitazione. Un'ulteriore percentuale dell'11,4% ovvero 355 casi aveva trascorso almeno una notte in luoghi diversi dall'abitazione abituale come alberghi, campeggi, navi, abitazioni private. Solo lo 0,3% ovvero 10 casi presentava altri fattori di rischio come il soggiorno in carcere o in comunità. L'82,5% (n. 2.567) dei casi è stato classificato come di origine comunitaria ovvero di origine non nota, poiché non è stata riportata alcuna permanenza al di fuori della propria abitazione durante il periodo di incubazione della malattia. Tuttavia, 30 soggetti hanno affermato di aver frequentato una piscina e 29 di essersi sottoposti a cure odontoiatriche. Il 54,3% dei pazienti affetti da legionellosi presentava altre patologie concomitanti, di cui il 73,1% di tipo cronico-degenerativo come diabete, ipertensione, broncopatia cronico-ostruttiva. Gli altri casi invece, riguardavano patologie di tipo neoplastico, autoimmune, infettivo, trapianti e altre.

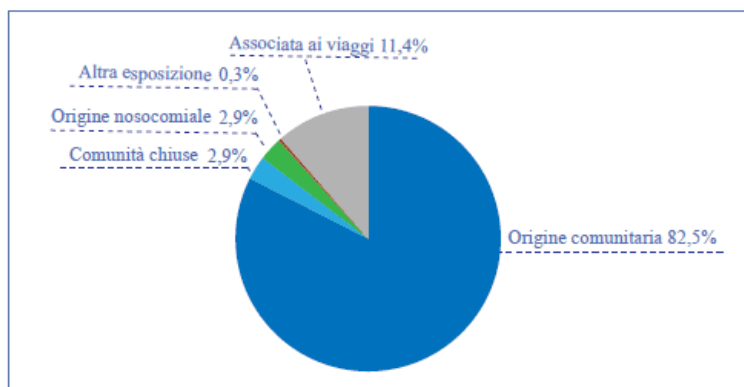


Figura 5: distribuzione percentuale dei casi di legionellosi per potenziale esposizione all'infezione

La **Tabella 4** riporta il numero di casi di legionellosi e la percentuale per esposizione e per Regione/Provincia Autonoma nel 2022.

Regione	Casi comunitari		Casi nosocomiali		Altre strutture sanitarie		Associati ai viaggi		Altre esposizioni		Totale n.
	n.	%	n.	%	n.	%	n.	%	n.	%	
Abruzzo	32	86,5	1	2,7	2	5,4	2	5,4	0	0,0	37
Basilicata	4	57,1	0	0,0	0	0,0	3	42,9	0	0,0	7
Calabria	3	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0	0	0,0	3
Campania	56	82,4	3	4,4	3	4,4	6	8,9	0	0,0	68
Emilia-Romagna	308	77,4	11	2,8	10	2,5	67	16,8	2	0,5	398
Friuli Venezia Giulia	84	88,4	3	3,2	1	1,1	7	7,4	0	0,0	95
Lazio	188	86,2	8	3,7	8	3,7	14	6,4	0	0,0	218
Liguria	78	83,0	0	0,0	7	7,4	9	9,5	0	0,0	94
Lombardia	797	83,5	29	3,0	18	1,9	106	11,1	5	0,5	955
Marche	61	84,7	4	5,6	3	4,2	3	4,2	1	1,4	72
Molise	7	87,5	1	12,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	8
PA di Trento	50	74,6	2	3,0	3	4,5	12	17,9	0	0,0	67
PA di Bolzano	25	73,5	0	0,0	1	2,9	8	23,6	0	0,0	34
Piemonte	172	80,0	3	1,4	13	6,0	26	12,1	1	0,5	215
Puglia	90	84,9	8	7,5	1	0,9	7	6,6	0	0,0	106
Sardegna	16	80,0	0	0,0	0	0,0	4	20,0	0	0,0	20
Sicilia	42	84,0	2	4,0	2	4,0	4	8,0	0	0,0	50
Toscana	280	85,6	7	2,1	6	1,8	34	10,4	0	0,0	327
Umbria	32	86,5	0	0,0	0	0,0	5	13,5	0	0,0	37
Valle d'Aosta	1	20,0	0	0,0	0	0,0	3	60,0	1	20,0	5
Veneto	241	81,7	8	2,7	11	3,7	35	11,8	0	0,0	295
Totale	2.567	82,5	90	2,9	89	2,9	355	11,4	10	0,3	3.111

Tabella 4: numero di casi di legionellosi e percentuale di esposizione per regione/provincia autonoma

La **Figura 6** riporta l'incidenza di casi di legionellosi per Regione/Provincia Autonoma nel 2022.

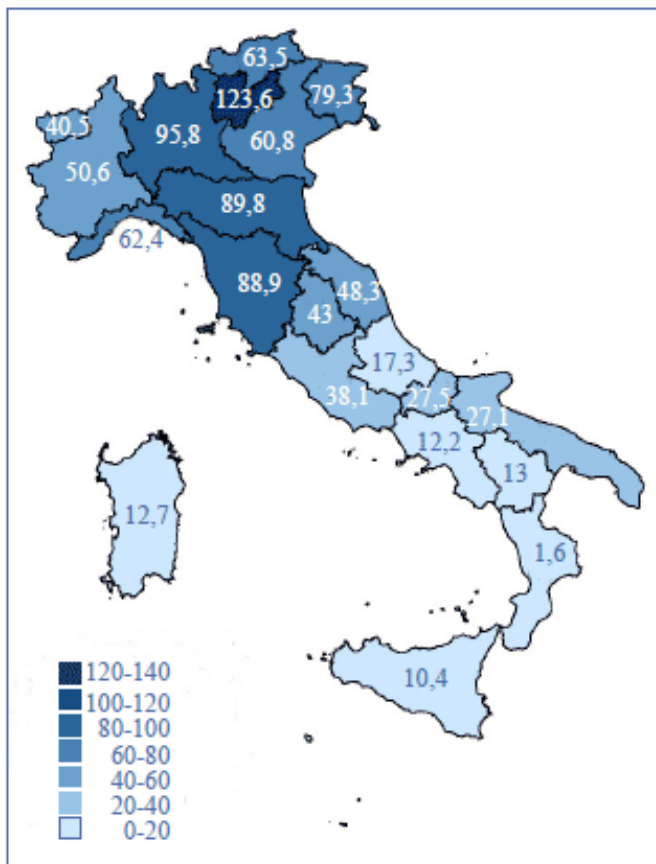


Figura 6: incidenza di casi di legionellosi per regione/provincia autonoma

1.2.2 Infezioni nosocomiali

Nel corso del 2022, sono stati segnalati 90 casi nosocomiali, rappresentanti il 2,9% dei casi totali notificati. Di questi, 46 casi ossia il 51,1% sono stati confermati come nosocomiali mentre 44 casi ossia il 48,9% sono stati classificati come presunti. La Figura 7 mostra l'andamento, dal 1997 al 2022, dei casi di legionellosi di origine nosocomiale confermata o presunta.

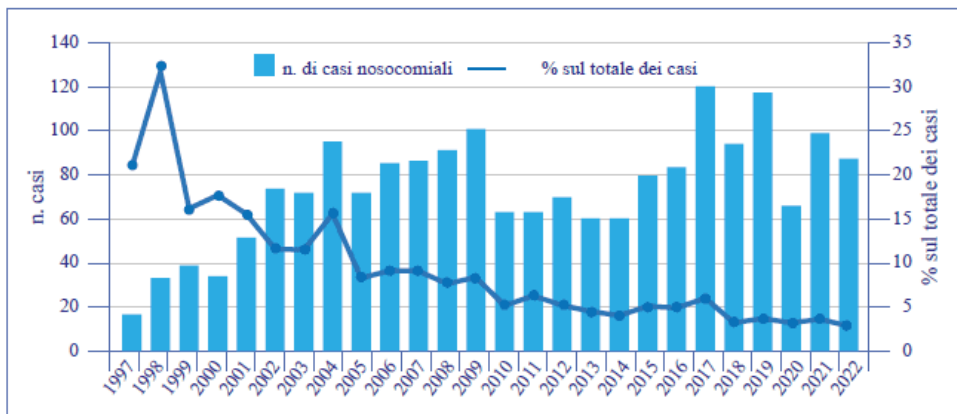


Figura 7: numero di casi di legionellosi di origine nosocomiale e relativa percentuale rispetto al numero totale di casi notificati

Il 78,8% dei casi nosocomiali è stato comunicato da Lombardia, Emilia-Romagna, Lazio, Puglia, Veneto e Toscana.

La figura 8 evidenzia la percentuale dei casi di origine nosocomiale sul totale dei casi per Regione di notifica.

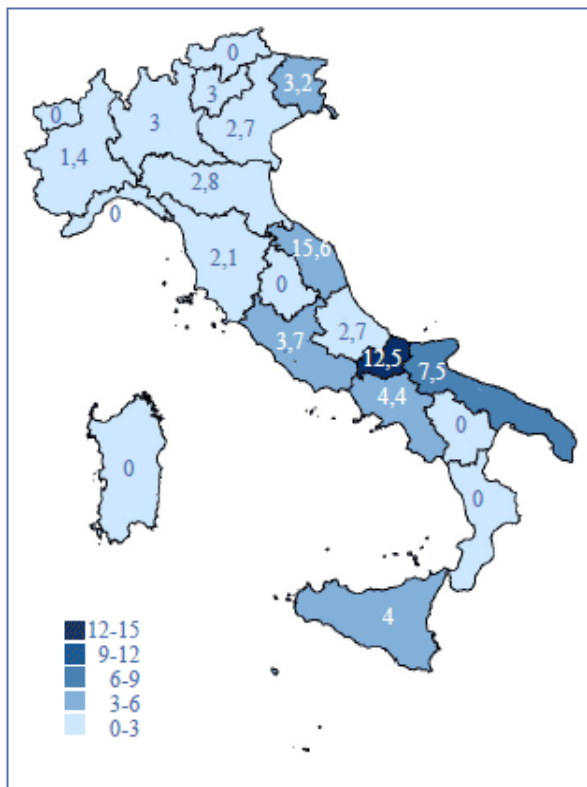


Figura 8: percentuale di casi di legionellosi di origine nosocomiale sul totale dei casi

L'età media dei casi nosocomiali si attesta a 73,9 anni, con un intervallo che va da 0 a 96 anni. Per i casi nosocomiali con l'esito della malattia noto, il tasso di letalità è pari al 57,6%. Inoltre, sono stati segnalati 89 casi legati a soggiorni in case di riposo o RSA.

1.2.3 Durata del ricovero ed esito della malattia

Escludendo i casi nosocomiali, la permanenza in ospedale ha una durata media di 9,9 giorni, nota nel 25,7% dei casi (intervallo 0-69, DS = 7,8).

L'esito della malattia è noto solo per il 26% dei pazienti, di cui l'83,7% si è completamente ripreso o comunque ha mostrato segni di miglioramento, mentre il 16,3% dei pazienti purtroppo sono deceduti. La letalità nei soli casi comunitari è del 14,9%, quindi significativamente inferiore rispetto a quella riscontrata nei casi nosocomiali precedentemente menzionati.

1.2.4 Cluster

Nel 2022 sono stati segnalati 98 cluster associati a strutture recettive italiane. Tra queste, 26 erano già state coinvolte in casi di legionellosi nei due anni precedenti. Complessivamente i cluster hanno coinvolto 182 turisti, con un'età media dei casi di 66,8 anni (intervallo 32-95), il 68,1% dei casi riguardava individui di sesso maschile con un rapporto maschi/ femmine di 2,1:1. La durata media del soggiorno è stata di 14 giorni e ciascun cluster ha coinvolto da 2 a 7 turisti.

In 42 strutture recettive (42,9%) i cluster erano composti esclusivamente da turisti italiani; in 35 strutture (35,7%) i turisti erano di nazionalità mista italiana e straniera (cluster identificati grazie alla rete di sorveglianza europea), mentre nelle rimanenti 21 strutture (21,4%) i cluster includevano solo soggetti stranieri.

Gli alberghi risultati positivi, sono state adottate adeguate misure di controllo che hanno riportato le cariche batteriche entro i limiti consentiti, come confermato dai campionamenti ambientali successivi alle operazioni di disinfezione. (www.epicentro.iss.it)

1.3 Prevenzione

Le infezioni causate dal batterio *Legionella*, in particolare le polmoniti, sono considerate un problema emergente in Sanità Pubblica, tanto che sono sottoposte a sorveglianza speciale da parte dell'Organizzazione Mondiale di Sanità (OMS), della Comunità Europea dove opera l'European Working Group for Legionella Infections e dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) di Roma. Quest'ultimo ha istituito dal 1983 il Registro Nazionale di Legionellosi.

Le attuali linee guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi richiedono che ogni struttura, sia essa civile o industriale con impianti potenzialmente a rischio *Legionella* devono applicare un *Protocollo di Controllo del Rischio legionellosi*. Questo protocollo si articola in tre fasi interconnesse:

- Valutazione del rischio: identificazione delle peculiarità della struttura e dei suoi impianti, individuando possibili contaminazioni da *Legionella spp.*; il responsabile comunica le informazioni relative alla Valutazione del rischio ed al relativo Piano di Controllo al gestore della struttura o a un suo delegato che, a loro volta, informano tutti coloro coinvolti nel controllo e nella prevenzione della legionellosi;
- Gestione del rischio: implementazione di interventi manutentivi e preparativi nonché l'adozione di procedure per eliminare o contenere le criticità individuate nella fase precedente;
- Comunicazione del rischio: informazione, formazione e sensibilizzazione dei soggetti potenzialmente a rischio (gestori degli impianti, personale addetto al controllo, esposti, ecc.).

A tale scopo è fondamentale fornire informazioni e formazione per assicurare l'applicazione corretta delle direttive di prevenzione e controllo della legionellosi.

I Dipartimenti di Prevenzione delle ASL devono organizzare attività formative/informative per:

- tecnici progettisti
- impiantisti
- albergatori e le loro associazioni di categoria
- responsabili di: strutture nosocomiali, strutture di riposo per anziani, edifici penitenziari, impianti sportivi, natatori, centri benessere, strutture ad uso

collettivo (ricoveri, teatri, cinema, centri commerciali, ecc.) e in generale di tutti gli edifici pubblici

- responsabili (Direttori, Responsabili del Servizio di Prevenzione e Protezione) della tutela della salute e sicurezza dei lavoratori nei siti civili, industriali, produttivi e le loro associazioni di categoria. L'obiettivo è facilitare l'acquisizione delle conoscenze necessarie a controllare l'intero ciclo di analisi e riduzione del rischio, adottando soluzioni impiantistico-gestionali per minimizzare il rischio nelle rispettive strutture di competenza.

Inoltre, i Dipartimenti di Prevenzione delle ASL devono considerare l'opportunità di informare i medici e la popolazione generale sulle misure utili a ridurre il rischio, specialmente nelle proprie abitazioni, soprattutto in presenza di pazienti immunocompressi.

1.3.1 Valutazione del rischio

Il Testo Unico sulla sicurezza sul lavoro 81/08 classifica la *Legionella* come agente biologico di classe 2, rappresentando un potenziale rischio per i lavoratori con probabilità limitante di propagarsi di diffusione. Dal 1983 è soggetta a sorveglianza sanitaria e all'articolo 271.

La valutazione del rischio Legionella, obbligatoria per legge, deve essere condotta dal gestore di ogni struttura ogni due anni ma preferibilmente annuale coinvolgendo figure competenti come igienisti e microbiologi.

Questa valutazione è cruciale per comprendere la vulnerabilità degli impianti per:

- determinare la proliferazione batterica al loro interno e l'esposizione ad aerosol d'acqua;
- stimare l'impatto sulla salute causato dagli impianti;
- attuare adeguate contromisure a mitigare il rischio.

L'ispezione accurata degli impianti a rischio è fondamentale per individuare i punti critici e garantire una valutazione completa, considerando sia le condizioni operative che i dettagli di manutenzione.

Il Rischio legionellosi è influenzato da vari fattori, tra cui quelli più significativi sono:

- Temperatura dell'acqua compresa tra 20 e 50°C.
- Presenza di tubazioni poco utilizzate o con flusso d'acqua minimo o assente.
- Utilizzo stagionale della struttura o di una parte di essa.

- Caratteristiche e manutenzione degli impianti e dei terminali di erogazione (pulizia, disinfezione).
- Caratteristiche dell'acqua di approvvigionamento a ciascun impianto (fonte di erogazione, disponibilità di nutrimento per *Legionella*, presenza di eventuali disinfettanti).
- Età, complessità e dimensioni dell'impianto.
- Modifiche o ampliamento dell'impianto esistente (lavori di ristrutturazione).
- Utilizzo di gomma e fibre naturali per guarnizioni e dispositivi di tenuta.
- Presenza e concentrazione di *Legionella*, rilevata tramite accertamenti ambientali precedenti (campionamenti microbiologici).

1.3.1.1 Periodicità della valutazione del rischio

Ogni 2 anni, ma preferibilmente ogni anno e in caso di lavori di ristrutturazione o rifacimento dell'impianto, i gestori devono eseguire e riesaminare regolarmente la valutazione del rischio specialmente in presenza di un esame batteriologico positivo con valori di *Legionella* che richiedono intervento. La valutazione del rischio deve essere soggetta a una revisione immediata in caso di segnalazione di un possibile caso di legionellosi.

In base ai risultati complessivi, è necessario redigere un Piano scritto per il controllo e la manutenzione di ciascun impianto a rischio coinvolgendo personale tecnico qualificato e specificando gli interventi da mettere in atto come pulizia e disinfezione e relative periodicità.

1.3.2 Gestione del rischio

Per garantire una riduzione e un controllo del rischio legato alla legionellosi, è essenziale adeguare le misure preventive. Se non è possibile implementare immediatamente tutte le misure di controllo e si rileva un potenziale rischio, come una temperatura dell'acqua calda sanitaria non conforme o la presenza di anomalie nella rete idrica, è necessario condurre un rapido campionamento per individuare la presenza di *Legionella*.

In base alla concentrazione di *Legionella* riscontrata, è fondamentale sviluppare un programma per applicare inizialmente misure correttive atte a contenere il rischio identificato. Fino a quando non sia possibile attuare tutte le misure correttive e di manutenzione derivanti dalla valutazione del rischio, è consigliabile ripetere il

campionamento ambientale mensilmente nei primi sei mesi e successivamente con una frequenza stabilita sulla base dell'analisi globale del rischio.

Nel caso di necessità di disinfezione di uno o più impianti, il piano di controllo dovrà essere aggiornato, considerando la periodicità del campionamento da rivalutare in base alle circostanze. Per le strutture a funzionamento stagionale, è imprescindibile eseguire il campionamento prima della riapertura.

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.

Tabella 5: Tipi di intervento indicati per concentrazione di *Legionella* (UFC/L) negli impianti idrici a rischio legionellosi esercitati in tutti i siti.

Legionella (UFC/L)	Intervento richiesto
Sino a 1.000	Verificare che le correnti pratiche di controllo del rischio siano correttamente applicate.
Tra 1.001 e 10.000	L'impianto idrico deve essere ricampionato, dopo aver verificato che le correnti pratiche di controllo del rischio siano correttamente applicate e dopo aver incrementato il dosaggio di un biocida appropriato. Se il risultato viene confermato, si deve effettuare una revisione della valutazione del rischio per identificare le necessarie ulteriori misure correttive.
Tra 10.000 e 100.000	Effettuare una disinfezione con un biocida appropriato e la revisione della valutazione del rischio, per identificare le necessarie ulteriori misure correttive, quale l'eventuale pulizia meccanica del bacino dell'impianto a supporto della disinfezione.
Maggiore di 100.000	Fermare l'impianto, effettuare una disinfezione con un biocida appropriato e la revisione della valutazione del rischio, per identificare le necessarie ulteriori misure correttive, quale l'eventuale pulizia meccanica del bacino dell'impianto a supporto della disinfezione. Riavviare l'impianto quando l'esito del campionamento dopo disinfezione torna a livelli <1000 UFC/L

Tabella 6: Tipi di intervento indicati per concentrazioni di *Legionella* (UFC/L) negli impianti di raffreddamento a torri evaporative o a condensatori evaporativi.

La valutazione del rischio *Legionella* si realizza attraverso la redazione del DVR *Legionella*, ottenuto mediante un sopralluogo nella struttura per raccogliere planimetrie degli impianti idrici ed aeraulici. Si identificano punti critici in cui la probabilità di sviluppo del biofilm e di *Legionella* è maggiore come boiler, docce, utenze (lavabi), rami morti, umidificatori, ma anche utenze poco impegnate, torri di raffreddamento etc..

Analisi passate che mi permettono di identificare se ci sono già stati casi di legionellosi in struttura, studio della popolazione e monitoraggio microbiologico precedono la stesura del Documento di Valutazione dei Rischi. Quest'ultimo include:

- la valutazione della popolazione suscettibile, ovvero la probabilità che i soggetti hanno di contrarre la malattia, sarà alta se la struttura ospita anziani, mentre sarà bassa se i soggetti hanno un'età compresa tra i 20 e 40 anni.
- la probabilità di sviluppo microbico all'interno degli impianti; ci saranno alti rischi in presenza di temperature intorno ai 50°C, di boiler che non vengono mai puliti o di rami morti e utenze mai usate.
- la probabilità di esposizione ad aerosol contaminati, valutando se ci sono mezzi come docce o torri evaporative che aumentano l'esposizione a potenziali aerosol pericolosi.

Tenendo in considerazione le caratteristiche sopracitate, a seconda della presenza di fattori di rischio, si possono avere tre profili di valutazione del rischio:

- rischio alto: sono presenti uno o più fattori in grado di aumentare il rischio;
- rischio medio: condizioni ottimali;
- rischio basso: assenza di fattori di rischio.

In aggiunta ai fini del DVR, è necessario effettuare anche una valutazione della gestione dell'impianto idrico o dell'impianto aeraulico. Anche in questo caso i gradi di valutazione sono tre:

- buona manutenzione se tutte le prescrizioni sono rispettate;
- sufficiente se si rispettano le prescrizioni principali con possibilità di migliorare la corrispondenza alle Linee Guida;
- insufficiente se prescrizioni principali non sono rispettate, richiedendo un potenziamento del sistema di gestione.

La valutazione dell'impianto è cruciale per identificare aree di intervento mirato al miglioramento della gestione del rischio. Integrando le valutazioni sul rischio manutenzione, si ottiene una valutazione complessiva.

Non è sufficiente valutare il rischio ma bisogna attuare un piano per ridurlo.

Oltre al DVR, che è un documento statico, una "fotografia" dello Stato degli impianti, è fondamentale sviluppare un registro di autocontrollo come parte dinamica del DVR. Questo registro, strutturato su base settimanale in un calendario annuale, elenca gli interventi necessari per ridurre i rischi individuati nella struttura.

Il registro di autocontrollo è specifico per la struttura oggetto di valutazione delineando azioni principali e universali come:

- settimanalmente deve essere effettuato il flussaggio delle utenze poco utilizzate, per minimizzare il rischio, in quanto la *Legionella* prolifera nelle acque stagnanti;
- mensilmente devono essere organizzate delle ispezioni sugli impianti, sui sistemi di dosaggio, sugli addolcitori, sulle tubature per assicurarne l'integrità;
- trimestralmente, la pulizia dei filtri dell'acqua e la valutazione dei rompigitto e dei soffioni poiché se in cattivo stato, sostituirli o disincrostarli e sanificarli;
- semestralmente la bonifica di torri evaporative, di condensatori, la disincrostazione degli accumuli di acqua calda (boiler), l'ispezione e la pulizia delle prese d'aria;

- annualmente si ispezionano e bonificano degli accumuli dell'acqua fredda, si iperclora la rete idrica per le strutture stagionali e si verifica l'integrità degli impianti aeraulici.

Il registro documenta sia attività ordinarie che sono quelle appena descritte sia straordinarie, fornendo una storia dettagliata dell'impianto per controlli esterni. Ogni azione posta sul registro deve essere corredata da data, firma di chi ha eseguito l'intervento e dal responsabile del registro.

La prevenzione delle infezioni da *Legionella* si fonda principalmente su due pilastri:

- la corretta progettazione e realizzazione degli impianti tecnologici che coinvolgono un riscaldamento dell'acqua e/o la sua nebulizzazione come impianti a rischio. Questi includono gli impianti idro-sanitari, gli impianti di condizionamento con umidificazione dell'aria ad acqua, gli impianti di raffreddamento a torri evaporative o a condensatori evaporativi, gli impianti che termali, le piscine e le vasche idromassaggio;
- l'adozione di misure preventive come la manutenzione e, se necessario, la disinfezione finalizzate a contrastare la proliferazione e la diffusione di *Legionella* negli impianti a rischio.

Pur non garantendo l'assenza completa di *Legionella* in un sistema o nei suoi componenti, tali misure contribuiscono a ridurre la probabilità di una contaminazione batterica grave.

1.3.3 Misure di prevenzione e azioni correttive

Le strategie di prevenzione e di controllo nel sistema idrico, mirate a evitare e limitare la contaminazione si articolano in misure a breve termine e misure a lungo termine.

Le misure a breve termine comprendono:

- Decalcificazione con soluzione acida, seguita da disinfezione con acqua fredda e cloro libero per almeno 30 minuti;
- Sostituzione periodica di tutti gli elementi di discontinuità come tubi, soffioni, filtri.

Per le misure a lungo termine si adottano approcci come:

- La microfiltrazione al punto di utilizzo mediante l'uso di filtri, con il fine di rimuovere totalmente la *Legionella* in uscita;
- Il trattamento termico mantenendo l'acqua all'interno degli impianti a 50°C-55°C in modo tale da inibire la proliferazione di *Legionella*, ricorrendo allo shock

termico che prevede di mantenere l'acqua a 70 -80°C per tre giorni e 30 minuti al giorno e alla disinfezione termica che prevede in primis di innalzare a 65°C la temperatura dell'acqua, successivamente di inibire la miscelazione con acqua fredda ed in ultima, si fa circolare l'acqua a 55°C-60°C per 30 minuti al giorno per tutto l'impianto.

- Irraggiamento UV: viene utilizzata la luce ultravioletta a 254 nm per inattivare i batteri dimerizzando la timina del DNA in modo da non permettere la loro replicazione;
- Clorazione: i due metodi di clorazione sono l'iperclorazione shock e l'iperclorazione continua. L'iperclorazione shock prevede l'utilizzo di 20 e 50 mg/L di cloro residuo libero derivanti dall'ipoclorito di sodio o di calcio, all'interno dell'impianto per un intervallo di tempo variabile tra 1 e 2 ore, in base alla concentrazione di cloro presente. Invece, l'iperclorazione continua prevede la 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 al cloro, il biossido di cloro risulta essere più efficace nei confronti del biofilm, in funzione dei materiali impiegati;
- Ozonizzazione: l'ozono essendo un ottimo biocida viene aggiunto all'acqua dell'impianto a una concentrazione di 1-2 mg/L con il fine di inibire la proliferazione di *Legionella* mediante la sua capacità di agire sul DNA dei microrganismi, danneggiandolo in modo irreversibile;
- Disinfezione con monocloramina: viene immessa in acqua ad una concentrazione pari a 2-3 mg/L. Ha la stessa modalità di azione del cloro ma avendo una maggiore persistenza in acqua le permette di agire anche nelle zone stagnanti e all'interno del biofilm.
- Ionizzazione rame-argento: il rame e l'argento provocano un'alterazione della permeabilità cellulare in quanto agiscono sulla parete cellulare del microrganismo ed insieme alla denaturazione proteica, determinano la lisi cellulare;
- Disinfezione con perossido di idrogeno e ioni di argento: Tale trattamento sfrutta l'azione battericida del perossido di argento e di ioni di argento;
- Disinfezione con acido peracetico.

Le contaminazioni di *Legionella* possono verificarsi sia in strutture ricettive che sanitarie.

La temperatura dell'acqua deve essere mantenuta sopra i 50°C per l'acqua calda sanitaria e sotto i 20°C per l'acqua fredda sanitaria in modo da inibire la moltiplicazione di *Legionella*. Oltre a questo, annualmente o in seguito a lavori, si consiglia di effettuare un'iperclorazione shock. Almeno due volte l'anno svuotare, pulire e disinfettare i bollitori e i serbatoi e, mensilmente, ispezionare i serbatoi, accertandosi che tutte le coperture siano intatte e posizionate correttamente e che modifiche apportate all'impianto o nuove installazioni non creino rami morti; adottare misure appropriate in caso di aumento di *Legionella*. È essenziale mantenere puliti, disinfettati e privi di incrostazioni docce, diffusori e rompigitto dei rubinetti, con la sostituzione quando necessario per garantire l'efficacia delle misure preventive.

1.3.4 Monitoraggio

Il monitoraggio delle matrici avviene in seguito all'analisi e all'applicazione di interventi correttivi. Questa fase cruciale valuta la necessità di adottare azioni correttive per gestire la possibile proliferazione incontrollata del batterio nella matrice analizzata. Il primo monitoraggio è eseguito dopo 48 ore dalla disinfezione, seguito da un secondo dopo un mese se il primo risulta essere negativo. Se anche il secondo è negativo, il terzo controllo avviene dopo tre mesi. In caso di esito negativo, l'ultimo controllo si svolge dopo sei mesi o secondo quanto stabilito nel Piano di controllo del rischio. In presenza di risultati positivi è necessario rivalutare le misure per correggere la contaminazione.

2. SCOPO DELLA TESI

Il presente lavoro, svolto presso il laboratorio di microbiologia situato presso Ecoopera Soc.coop. di Trento, si propone di studiare il batterio *Legionella spp.* nelle acque idrosanitarie utilizzando il metodo ISO 11731:2017. Sono stati presi in considerazione cento campioni prelevati in luoghi differenti come Ospedali, Case di Cura, hotel e abitazioni e per un periodo di tempo compreso tra marzo 2023 e ottobre 2023.

A differenza della maggior parte degli studi presenti in bibliografia relativi al confronto tra metodo colturale e metodo in PCR l'obiettivo del presente lavoro è valutare se ci siano delle differenze significative tra i risultati ottenuti dall'analisi dei campioni analizzati tali quali e dopo trattamento sia termico (alla temperatura di 50°C) che acido (utilizzando una soluzione acida HCl-KCl). Come indicato dal metodo i due trattamenti utilizzati sono finalizzati all'abbattimento di eventuali microorganismi che potrebbero interferire con il batterio *Legionella*.

Il batterio *Legionella pneumophila* è un patogeno umano opportunista, Gram-negativo, ubiquitario negli ambienti acquatici. Il microorganismo può risiedere in sistemi idrici artificiali come unità di condizionamento dell'aria, fontane, torri di raffreddamento, centri termali e conduttori di acqua potabile. *L. pneumophila* può tollerare temperature fino a 50 °C e, con alcuni ceppi, mostra una resistenza variabile al cloro libero e agli ioni metallici. Essa può causare un'infezione potenzialmente pericolosa per la vita nota come malattia dei legionari, derivante dall'inalazione di batteri. Sebbene anche altre specie di *Legionella* possano causare infezioni respiratorie, *L. pneumophila*, in particolare il sierogruppo 1, è l'organismo più implicato, come suggerito dai dati del Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC). Ciò è rafforzato dai dati dei Centri statunitensi per il controllo delle malattie (CDC) che mostrano che tutti i decessi dovuti all'epidemia sono stati causati da *L. pneumophila*. (Karia et al., 2023)

3. MATERIALI E METODI

La prima operazione da eseguire in ogni procedimento analitico è il campionamento, vale a dire un'operazione delicata e complessa che può condizionare i risultati di tutte le fasi che seguono.

Nelle Linee Guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi – Allegato 3 vengono riportati i metodi di campionamento, trasporto e conservazione dei campioni ambientali per la ricerca di *Legionella*.

Il campionamento per la *Legionella* deve essere eseguito prima di qualsiasi intervento di disinfezione oppure a distanza di un tempo appropriato dalla sua esecuzione (circa dopo 48 ore dall'avvenuta messa a regime dell'impianto post intervento).

Il tecnico impiegato al campionamento non deve appartenere ad una categoria a rischio ed è essenziale che:

- quando opportuno indossi dispositivi di protezione individuale come nel caso di campionamenti in cui non è possibile lo spegnimento di torri di raffreddamento che determinano, nei confronti del campionatore, un'esposizione a rischio;
- minimizzi la formazione di aerosol facendo scorrere l'acqua delicatamente dall'erogatore oggetto del campionamento;
- eviti l'esposizione ad aerosol;

Ove possibile e necessario, richiedere la disattivazione delle torri di raffreddamento o dei condensatori evaporativi, almeno 20 minuti prima di effettuare il campionamento.

3.1 Campionamento

La UNI EN ISO 19458:2006 intitolata "Water quality – Sampling for microbiological analysis" è la normativa che regola il campionamento della *Legionella*.

La *Legionella* è ricercata nell'ambiente idrico artificiale come impianti d'acqua destinati al consumo umano, impianti aeraulici, impianti di raffreddamento, torri e/o condensatori evaporativi, fontane decorative, idromassaggi, apparecchiature mediche per la respirazione assistita, impianti d'acqua termale e qualunque altro impianto risulti evidenziato dalla valutazione del rischio legionellosi o da osservazioni effettuate sul campo, limitando i prelievi nei punti maggiormente critici, sia in funzione dei dati epidemiologici, sia in base allo schema di ciascun impianto a rischio.

3.1.1 Materiale occorrente per il campionamento

Durante il campionamento è essenziale utilizzare dispositivi di protezione individuale come guanti, maschere, occhiali.

Portare con sé una borsa isoterma per il trasporto dei campioni, delle bottiglie sterili di polipropilene (PP) con almeno 1L di capacità, contenenti una concentrazione di tiosolfato di sodio pentaidrato se si sospetta l'uso di cloro come disinfettante. Nel caso di ioni rame o argento come disinfettanti, neutralizzarli con EDTA. Utilizzare dei contenitori in vetro o polietilene sterili per raccogliere depositi e incrostazioni, dei tamponi sterili (cotone, poliestere o altro materiale), un termometro digitale tarato con sensibilità 0,1 °C e dell'alcool isopropilico (propanolo) 70%, possibilmente in formato spray.

I campioni sono principalmente rappresentati da:

- acqua del circuito dell'acqua calda e fredda sanitaria soprattutto qualora la temperatura sia superiore a 20°C;
- depositi (cosiddetti "fanghi") o sedimenti da serbatoi e altri punti di raccolta dell'acqua;
- incrostazioni da tubature e serbatoi;
- biofilm e/o altro materiale sulle superfici interne delle tubazioni, allo sbocco di rubinetti, nei filtri rompigitto, all'interno del diffusore delle docce, da raccogliere utilizzando dei tamponi;
- acqua d'umidificazione degli impianti aeraulici;
- acqua dell'impianto di raffreddamento a torri evaporative/condensatori evaporativi;
- filtri da impianti di climatizzazione;
- aria umidificata (ad es. quella che fuoriesce dalle torri evaporative/condensatori evaporativi);
- acqua da vasche idromassaggio, fontane decorative;
- acqua da sistemi per la respirazione assistita, aerosol;
- acqua e altre matrici tipiche di stabilimenti termali.

3.1.2 Modalità di prelievo

Acqua calda

Se possibile, il volume deve essere almeno di 1 litro. L'acqua sarà raccolta in bottiglie sterili contenenti una soluzione al 10% di sodio tiosolfato, in proporzione di 0,1 ml ogni 100 ml di acqua.

Nel caso della ricerca di *Legionella*, **in condizioni di utilizzo comune** ovvero un campione istantaneo per simulare l'esposizione potenziale di un utente è necessario:

- prelevare l'acqua senza flambare o disinfettare al punto di sbocco, senza farla scorrere precedente e misurare la temperatura.

Per la ricerca di *Legionella* **all'interno dell'impianto** al fine di monitorarne le condizioni d'igiene:

- far scorrere l'acqua per almeno un minuto;
- chiudere il flusso e flambare sia all'interno che all'esterno dello sbocco e successivamente disinfettare con ipoclorito al 1% o etanolo al 70% lasciandolo agire per almeno 60 secondi;
- fare scorrere l'acqua per un ulteriore minuto per rimuovere l'eventuale disinfettante;
- misurare la temperatura ponendo il termometro nel flusso d'acqua e attendere il tempo necessario affinché raggiunga un valore pressoché costante;
- prelevare il campione.

Si consiglia di applicare questa modalità di campionamento durante i monitoraggi microbiologici di autocontrollo di routine.

Acqua fredda

Nella ricerca di *Legionella* **in condizioni di utilizzo comune** è necessario:

- prelevare l'acqua senza flambare o disinfettare al punto di sbocco, senza farla scorrere precedentemente e misurare la temperatura ponendo il termometro al centro del flusso prima del prelievo del campione.

Per la ricerca di *Legionella* nell'acqua **all'interno dell'impianto** di acqua fredda il campione si può prelevare seguendo quanto è stato descritto per l'acqua calda. Se la temperatura dell'acqua nell'impianto è $\leq 20^{\circ}\text{C}$ il numero di campioni può essere ridotto.

3.1.3 Campionamento negli impianti idrosanitari

Nel sistema idrosanitario, sebbene il batterio si riscontri più spesso nell'impianto di distribuzione dell'acqua calda, è essenziale eseguire il campionamento anche per l'impianto di distribuzione dell'acqua fredda sanitaria. Ciò deve avvenire in relazione ai risultati della valutazione del rischio e in situazioni come la manifestazione di un caso. Si raccomanda il monitoraggio completo del percorso dell'acqua (punto di alimento idrico della rete, ossia dall'allacciamento all'acquedotto od al punto d'emungimento d'acqua di pozzo) fino ai terminali di utilizzo come gli erogatori sentinella. I principali punti di controllo per la mappatura analitica della rete idrica oggetto d'indagine includono:

- allacciamento all'acquedotto od al punto d'emungimento d'acqua di pozzo;
- accumuli di acqua fredda destinata al consumo umano, serbatoi/bollitori acqua calda sanitaria (alla base e ad 1/3 dell'altezza, quando possibile);
- tutti i siti in cui possono essere presenti fenomeni di ristagno, sedimentazione od incrostazioni significative;
- utenze poco utilizzate;
- ricircolo dell'acqua calda sanitaria (anello di distribuzione);
- erogatori a servizio di bagni e/o docce distali (erogatori sentinella);
- addolcitori.

Il campionamento dei punti di controllo deve riguardare l'acqua sanitaria sia calda che fredda.

3.1.4 Campionamento nelle strutture turistico-ricettive

Per le strutture a funzionamento stagionale, è essenziale eseguire il campionamento prima della riapertura. Il prelievo deve avvenire prima di qualsiasi intervento di disinfezione o azione preventiva come pulizia e/o disinfezione con qualunque metodo oppure a distanza di un tempo adeguato dalla sua esecuzione (rif. dopo circa 48 ore dall'avvenuta messa a regime dell'impianto post intervento). È consigliabile adattare il numero di campioni alle dimensioni dell'impianto. Per ciascun impianto di acqua calda sanitaria devono essere effettuati almeno i seguenti prelievi:

- mandata (oppure dal rubinetto più vicino al serbatoio/i);
- ricircolo o fondo serbatoio/i;

- almeno 3 punti rappresentativi (ovvero i più lontani nella distribuzione idrica e i più freddi).

Per ciascun impianto di acqua fredda devono essere effettuati almeno i seguenti prelievi:

- fondo serbatoio/i;
- almeno 2 in punti rappresentativi (ovvero il più lontano nella distribuzione idrica ed il più caldo).

3.2 Trasporto e conservazione

I campioni prelevati devono essere conservati necessariamente a $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, trasportati in un contenitore in grado di mantenere tale temperatura, al riparo dalla luce, avendo cura di separare i campioni di acqua calda da quelli di acqua fredda e consegnati in tempo utile affinché l'analisi venga iniziata il più presto possibile e comunque non oltre i 4 giorni dal prelievo.

3.3 Metodo utilizzato

La norma ISO 11731:2017 comprende più metodiche e pertanto - per scegliere la tecnica analitica più adatta al campione in esame – è necessario considerare diversi fattori, come ad esempio l'origine del campione stesso, la concentrazione di *Legionella spp.* e la concentrazione di interferenti.

La matrice decisionale (qui di seguito riportata) è descritta nell'allegato J della norma ed in base ad essa il laboratorio ha valutato di utilizzare il metodo 8.4.3.1, corrispondente a bassa concentrazione sia di Legionella che di interferenti e che prevede la filtrazione del campione sia tal quale (obbligatorio) che dopo trattamento termico (opzionale) e acido (obbligatorio) e la posa diretta della membrana su piastra. Solo per questo studio il Laboratorio ha deciso di effettuare anche il trattamento termico nelle analisi di routine.

* OBBLIGATORIO				MATRICE A	MATRICE B	MATRICE C
				BASSA CONCENTRAZIONE DI INTERFERENTI	ALTA CONCENTRAZIONE DI INTERFERENTI	CONCENTRAZIONE MOLTO ELEVATA DI INTERFERENTI
				Acque destinate al consumo umano	Torri di raffreddamento	Acque di scarico
					Acque di processo	Acque superficiali
				Acque da unità dentali		
ALTA CONCENTRAZIONE DI LEGIONELLA (> 10 ⁶) 8.4.2	SEMINA DIRETTA SU PIASTRA	NT	1	BCYE Agar * BCYE + AB Agar *	BCYE + AB Agar GVPC Agar *	
		TT	2	BCYE Agar BCYE + AB Agar	BCYE + AB Agar GVPC Agar *	
		TA	3	BCYE Agar BCYE + AB Agar	BCYE + AB Agar GVPC Agar *	
		Combinato	4		BCYE + AB Agar GVPC Agar	BCYE + AB Agar GVPC Agar *
BASSA CONCENTRAZIONE DI LEGIONELLA 8.4.3	MF SU PIASTRA 8.4.3.1	NT	5	BCYE Agar * GVPC Agar		
		TT	6	BCYE Agar GVPC Agar	BCYE + AB Agar GVPC Agar	
		TA	7	BCYE Agar GVPC Agar *	BCYE + AB Agar GVPC Agar	
	FILTRAZIONE CON PROCEDURA DI LAVAGGIO 8.4.3.2	NT	8	BCYE Agar * GVPC Agar *	BCYE + AB Agar GVPC Agar *	
		TT	9	BCYE Agar * GVPC Agar *	BCYE + AB Agar GVPC Agar *	
		TA	10	BCYE Agar * GVPC Agar *	BCYE + AB Agar GVPC Agar *	
DOPO DILUIZIONE		NT	11	BCYE Agar GVPC Agar con dil 1:10	BCYE + AB Agar GVPC Agar * con dil 1:10	
		TT	12	BCYE Agar GVPC Agar con dil 1:10	BCYE + AB Agar GVPC Agar * con dil 1:10	
		TA	13	BCYE Agar GVPC Agar con dil 1:10	BCYE + AB Agar GVPC Agar * con dil 1:10	
		Combinato	14		BCYE + AB Agar GVPC Agar con dil 1:10	BCYE + AB Agar GVPC Agar * con dil 1:10 e 1:100

Figura 9: decisione matrice

Come buona prassi di laboratorio tutto il materiale utilizzato deve essere sottoposto a sterilizzazione preventiva al fine di evitare contaminazioni. Le pinzette devono essere

sterilizzate tramite il becco Bunsen a pedale ogni volta che si utilizzano per spostare il filtro dalla rampa alla capsula Petri con il terreno. Inoltre, è essenziale l'uso di pipette sterili qualora si usassero per il prelievo del campione da sottoporre alla filtrazione. Per la sicurezza del personale tecnico, è obbligatorio indossare i dispositivi di protezione individuale appropriati come camice e guanti, in base al tipo di analisi in corso.

3.3.1 Strumentazione

- Rampa filtrante: realizzata in acciaio inox, può essere composta da tre o sei unità filtranti, ciascuna dotata di un imbuto rimovibile e di una superficie filtrante su cui viene posizionato il filtro (preferibilmente nero) durante la procedura di filtrazione dei campioni.



Figura 10: rampa di filtrazione in acciaio inox

- Incubatore a 36 °C
- Cappa flusso laminare

3.3.2 Terreni e reattivi

Terreni utilizzanti:

- Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) agar: è un terreno standard per la crescita di *Legionella spp.* selettivo formulato in accordo con la norma ISO 11731:2017 che consente un recupero ottimale delle Legionelle da diverse matrici: campioni clinici, tamponi, sedimenti, Acque (grezze, minerali, reflue). Il terreno si basa sulla formulazione di Edelstein ed è caratterizzato dalla presenza di carbone attivo che assorbendo alcune sostanze tossiche presenti, nell'estratto di lievito, favorisce insieme ai fattori di crescita pirofosfato e cloridrato di cisteina la crescita delle Legionelle. Il tampone ACES permette di raggiungere il pH ottimale per questa specie. Il terreno diventa selettivo con l'aggiunta di diverse miscele antibiotiche.
- Glycine Vancomycin Polymyxin Cycloheximide (GVPC) agar: è un terreno standard selettivo per la crescita di *Legionella spp.*; arricchito con cicloeximide che sopprime la crescita dei funghi ma è fortemente tossica per contatto ed inalazione.
- Tryptone Soy Agar (TSA): è un terreno di isolamento non selettivo, altamente nutritivo utilizzato per la crescita di batteri che non hanno requisiti nutrizionali specifici ma non in grado di supportare la crescita di *Legionella spp.*

Reattivi utilizzati:

- Soluzione acida: si preparano due soluzioni (A e B) dove:
 - 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 B è una soluzione di cloruro di potassio 0,2 molare formata da 14,9 g di KCl in un litro di acqua
 - per preparare la soluzione acida si uniscono 3,9 ml della soluzione A e 25 ml della soluzione B, aggiustando il pH finale della soluzione a $2,2 \pm 0,2$ con KOH. Essa viene conservata al riparo dalla luce per massimo un mese e sterilizzata in autoclave a $121 \pm 3^\circ\text{C}$ per 15 ± 1 minuti.

- Test al lattice per l'agglutinazione (LEGIONELLA LATEX TEST KIT 3x50 codice DR0800M) in grado di identificare:
 - ✚ *Legionella pneumophila* serogroup 1
 - ✚ *Legionella pneumophila* serogroup 2-14
 - ✚ Legionella species (*Legionella longbeachae* 1 & 2 *Legionella bozemanii* 1 & 2 *Legionella dumoffii* *Legionella gormanii* *Legionella jordanis* *Legionella micdadei* *Legionella anisa*)

3.3.3 Procedura analitica

I campioni sono stati sottoposti a tre tipi di trattamento: assenza di trattamento (NT), trattamento acido (TA) e trattamento termico (TT).

Dopo aver posizionato sulla rampa dei filtri sterili di nitrocellulosa con diametro dei pori di 0,45 µm (preferibilmente di colore nero per facilitare il riconoscimento delle colonie) si agita molto bene il campione per assicurarne l'omogeneità e evitare stime errate della concentrazione.

A: non trattato (NT):

1. Filtrare utilizzando la rampa più volumi di campione: nel nostro caso 100 ml, 10 ml e 1 ml;
2. Togliere il filtro e posizionarlo su piastra contenente il terreno BCYE;
3. Incubare a 36°C ±1 °C (preferibilmente in un contenitore chiuso) per 10 giorni effettuando delle letture intermedie.

B: trattamento termico (TT):

1. Effettuare il trattamento termico del campione nel seguente modo:
 - prelevare una quantità sufficiente di campione in bottiglie sterili
 - porre a bagnomaria a 50 ± 1°C per 30 ± 2 minuti;
2. Filtrare utilizzando la rampa più volumi di campione: nel nostro caso 100 ml, 10 ml e 1 ml;
3. Togliere il filtro e posizionarlo su piastra contenente il terreno GVPC;
4. Incubare a 36°C ±1 °C (preferibilmente in un contenitore chiuso) per 10 giorni effettuando delle letture intermedie.

C: trattamento acido (TA):

1. Filtrare utilizzando la rampa più volumi di campione: nel nostro caso 100 ml, 10 ml e 1 ml;

2. Per ognuno effettuare il trattamento acido del campione nel seguente modo:
 - versare all'interno di ogni imbuto di filtrazione 30 ml di tampone acido fino a coprire il filtro di nitrocellulosa e lasciare a contatto per cinque minuti;
 - filtrare il tutto;
 - al fine di neutralizzare l'azione acida del tampone precedentemente inserito lavare aggiungendo 20 ml di acqua sterile e filtrare nuovamente.
3. Togliere il filtro e posizionarlo su piastra contenente il terreno GVPC;
4. Incubare a 36°C ±1 °C (preferibilmente in un contenitore chiuso) per 10 giorni effettuando delle letture intermedie.

Laddove applicabile le analisi sono state eseguite in batteria.

D: lettura e conferma

Le piastre vengono visionate ogni due giorni per valutare l'eventuale necessità di ulteriori diluizioni e la lettura con conteggio delle colonie viene eseguita tendenzialmente al sesto/settimo giorno e al decimo. Poiché il metodo prevede una fase di conferma il numero di colonie contate è presuntivo e rappresenta una stima del risultato.

Durante la lettura si effettua il conteggio sia delle colonie tipiche che di quelle non tipiche; secondo la norma le colonie tipiche presentano le seguenti caratteristiche:

- piccole dimensioni
- leggermente convesse
- bianco-grigie
- dense centralmente e bordi sfumati
- consistenza mucosa

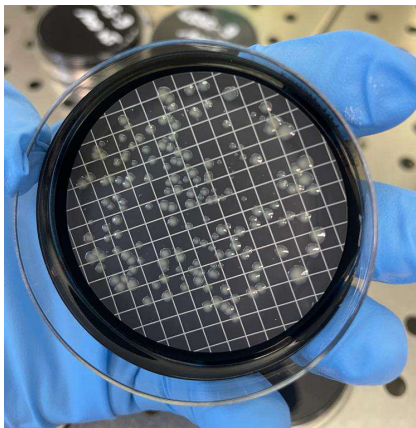


Figura 11: colonie tipiche di *Legionella*

Le colonie individuate durante la fase di lettura delle piastre sono sottoposte a conferma, che consiste nello strisciare ogni colonia su due terreni, uno selettivo (BCYE agar) e uno non selettivo (TSA) su cui la *Legionella* non è in grado di crescere.

Nel caso in cui siano presenti colonie aventi morfologie diverse, bisogna prelevare almeno una colonia per ciascun tipo; se è presente un solo tipo di colonia, se ne selezionano almeno 3.

I terreni di conferma vengono incubati a 36°C per 2-5 giorni.

Si possono ottenere quattro casistiche:

- ✓ crescita solo su BCYE: si tratta di colonie del genere *Legionella*
- ✓ crescita solo su TSA: non si tratta di colonie del genere *Legionella*
- ✓ crescita sia su BCYE che su TSA: non si tratta di colonie del genere *Legionella*
- ✓ nessuna crescita ne su BCYE ne su TSA: non si tratta di colonie del genere *Legionella*



Figura 12: conferma delle colonie di *Legionella* su terreno TSA e BCYE

Tutte le colonie identificate come *Legionella* vengono poi sottoposte ad identificazione sierologica tramite il test di agglutinazione al lattice (Latex test), che impiega sfere di lattice contenenti antigeni specifici del patogeno in questione. Tale test consente l'identificazione del sierogruppo 1, dei sierogruppi 2-14 della *Legionella pneumophila* e il rilevamento di altre sette specie di *Legionella*.

Il test di agglutinazione al lattice (Latex test) viene eseguito come segue:

1. portare i reagenti al lattice a temperatura ambiente e assicurarsi che le sospensioni di lattice siano mescolate agitando vigorosamente;

2. erogare 1 goccia di ciascuno dei reagenti al lattice su 4 cerchi all'interno del cerchio e vicino al bordo su una scheda di reazione;
3. aggiungere 1 goccia di sospensione tampone diluente a ciascuno dei 4 cerchi del test. Assicurarsi che il reagente e il tampone non si mescolino in questa fase;
4. prelevare con un'ansa la colonia di almeno 1 mm (utilizzarne 2 o più se le colonie sono più piccole) ed emulsionare accuratamente nel tampone;
5. mescolare insieme i reagenti al lattice e le sospensioni e distribuirli per coprire le aree di reazione utilizzando l'ansa;
6. oscillare delicatamente la carta con un movimento circolare. Non scuotere la carta per più di 1 minuto e non utilizzare lenti di ingrandimento per facilitare la lettura del risultato;
7. al termine, smaltire la scheda di reazione in un contenitore idoneo;
8. richiudere le bottiglie e rimetterle in frigorifero.

Il risultato è positivo se l'agglutinazione delle particelle di lattice di polistirene blu (formazione di grumi) avviene entro 1 minuto. Una reazione positiva indica che nel campione sono stati rilevati antigeni di quel sierogruppo della specie *Legionella*.

Si ottiene un risultato negativo invece, se non si verifica alcuna agglutinazione e la sospensione blu rimane liscia dopo 1 minuto.

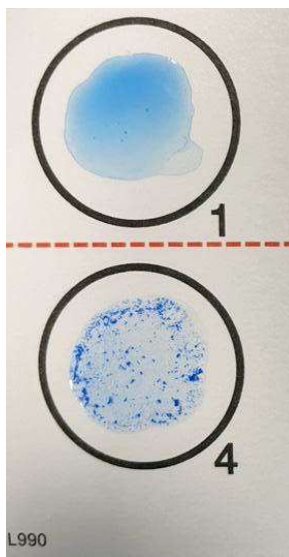


Figura 13: test di agglutinazione (pozzetto 1 esito negativo, pozzetto 4 esito positivo)

3.3.4 Espressione dei risultati

I dati ottenuti vengono espressi come indicato nella ISO 11731:2017.

Inizialmente viene eseguito il calcolo del numero di colonie confermate di Legionella (a), mediante la seguente formula:

$$a = \frac{\text{colonie confermate positive}}{\text{colonie confermate}} \times \text{colonie totale}$$

Per il metodo “filtrazione e deposito della membrana”, poiché si utilizzano piastrine del diametro di 60 mm, il numero di colonie totali deve essere inferiore o uguale a 80. La concentrazione di Legionella (Cs) si calcola tenendo conto del parametro a, del volume totale di campione testato (Volume filtrato) e del volume di riferimento scelto per esprimere la concentrazione dei microrganismi nel campione (Vs), che secondo la normativa è pari a 1000 ml.

$$Cs = \frac{a}{V_{\text{filtrato}}} \times$$

3.3.5 Test statistici utilizzati:

3.3.5.1 Test t a due code (dati accoppiati)

Per confrontare i risultati abbiamo eseguito il test t di Student a due code.

Il test t di Student consente di confrontare le medie di due gruppi per capire se la differenza osservata è reale o dovuta al caso.

Esso prevede la formulazione di una ipotesi nulla (H0), secondo la quale le medie dei due gruppi sono uguali tra di loro, cioè la loro differenza (μ) è pari a zero.

$$H_0: \bar{X}_1 = \bar{X}_2 \rightarrow \mu = 0$$

Ne deriva che l'ipotesi alternativa (H1) sostiene che le medie dei due gruppi sono diverse tra di loro.

Si applicano le seguenti formule:

$$t_{sp} = \frac{\bar{d} - \mu}{\frac{Sd}{\sqrt{n}}} = \frac{\bar{d}}{\frac{Sd}{\sqrt{n}}}$$

$$Sd = \sqrt{\frac{\sum(di - \bar{d})^2}{n - 1}}$$

$$t \text{ tab } (\alpha, \text{gdl}) = t_{(0,05;25)} = 2,06$$

dove:

t sp = t calcolato

\bar{d} = media delle differenze tra le due serie

μ = differenza tra le serie considerata dall'ipotesi nulla (in questo caso pari a zero)

Sd = deviazione standard delle differenze

n = numero di coppie

t tab = valore di t tabulato

gdl = gradi di liberta (n-1)

Il t sp calcolato viene poi confrontato con quello teorico:

- Se il valore calcolato è compreso nell'intervallo costituito da $\pm t \text{ tab}$ ($-t \text{ tab} \leq t \text{ sp} \leq +t \text{ tab}$) viene accettata l'ipotesi nulla (H0) e le medie dei due gruppi sono considerate uguali tra di loro.
- se il t sp non è compreso nell'intervallo ($t \text{ sp} < -t \text{ tab}$ o $t \text{ sp} > t \text{ tab}$) H0 viene rifiutata e le medie dei due gruppi sono considerate diverse tra di loro

3.3.5.2 Test di correlazione r di Pearson

Il coefficiente di correlazione r è una tecnica statistica che permette di valutare la correlazione lineare tra due variabili quantitative; corrisponde al rapporto tra la covarianza delle due variabili e il prodotto delle loro deviazioni standard e viene calcolato secondo la seguente formula (per il calcolo è stato utilizzato il software Excel):

$$r = \frac{\text{Covarianza}(X, Y)}{s(x) * s(y)}$$

dove

r = coefficiente di correlazione

s (x) = deviazione standard di x

$s(y)$ = deviazione standard di y

La correlazione massima ($r = \pm 1$) si ha quando tutti i punti giacciono su una retta (per questo si parla di correlazione lineare). Ne consegue che r è compreso tra -1 (perfetta relazione negativa lineare tra le due variabili) e +1 (perfetta relazione positiva lineare tra le due variabili) e che più si avvicina agli estremi (± 1) più la relazione è forte.

Per valutarne la significatività viene utilizzato il test t , che prevede la formulazione di due ipotesi:

- ✚ H0 (ipotesi nulla): non esiste correlazione lineare tra le due serie ($r = 0$)
- ✚ H1: esiste correlazione lineare tra le due serie ($r \neq 0$)

Per verificare le ipotesi vengono applicate le seguenti formule:

$$t(r) = \frac{r}{ES(r)}$$

$$ES(r) = \sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}}$$

$t_{tab}(\alpha, gdl) = t_{(0,05;24)} = 2,06$

dove:

$t(r)_{sp}$ = t calcolato

r = coefficiente di correlazione

$ES(r)$ = errore standard di r

n = numero di dati

t_{tab} = valore di t tabulato

gdl = gradi di liberta ($n-2$)

Il t_{sp} calcolato viene poi confrontato con quello teorico:

- ✚ Se il valore calcolato è compreso nell'intervallo costituito da $\pm t_{tab}$ ($-t_{tab} \leq t_{sp} \leq +t_{tab}$) viene accettata l'ipotesi nulla (H0) e non esiste correlazione lineare tra le due serie;
- ✚ se il t_{sp} non è compreso nell'intervallo ($t_{sp} < -t_{tab}$ o $t_{sp} > t_{tab}$) H0 viene rifiutata e esiste correlazione lineare tra le due serie.

3.3.5.3 Regressione lineare

La regressione lineare è un metodo utilizzato per prevedere il valore di una variabile numerica (y) in base a quello di una seconda variabile (x). E' applicabile laddove esiste una relazione lineare significativa tra le due variabili ($r \neq 0$)

Vengono applicate le seguenti formule (per il calcolo è stato utilizzato il software Excel):

$$y = ax + b$$

$$b = \frac{\text{Covarianza}(X, Y)}{\text{varianza}(x)}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$R^2 = \frac{SS_{\text{regressione}}}{SS_{\text{totale}}}$$

dove

y = variabile dipendente (indicata sull'asse delle ordinate)

x = variabile indipendente (indicata sull'asse delle ascisse)

a = pendenza della retta

b = intercetta della retta con l'asse x

\bar{x} = x medio

\bar{y} = y medio

R^2 = coefficiente di determinazione o di adattamento ai dati

$SS_{\text{regressione}}$ = somma dei quadrati della regressione o devianza della regressione

SS_{totale} = somma dei quadrati totale o devianza totale

L' R^2 misura la percentuale di variazione Y spiegata da X e il suo valore sarà sempre compreso tra 0 ed 1, oppure tra 0% e 100% se lo si vuole esprimere in termini percentuali. Esso è espressione di quanto i dati reali si avvicinano al modello di regressione lineare calcolato:

✚ più R^2 è prossimo a zero più i punti si discostano dalla retta di regressione

✚ più R^2 è prossimo a 1 più i punti si avvicinano alla retta di regressione

Quando il coefficiente di determinazione è uguale ad 1, anche l'indice di correlazione r sarà uguale ad 1 oppure a -1. In questo caso non c'è quindi nessun errore di previsione

nell'utilizzare x per prevedere y . In altre parole, i valori osservati della y coincidono esattamente con i valori della y stimati dal modello.

4. RISULTATI E DISCUSSIONI

Sono stati analizzati circa 100 campioni d'acqua di cui 40 con esito negativo (*Legionella spp.* < 10 UFC/1000 ml) e pertanto non utilizzabili per un confronto tra i diversi trattamenti. Dei rimanenti solo 26 sono stati elaborati, in quanto per gli altri il NT è risultato essere non interpretabile (colonie presenti sulla piastra > 80 o confluenti).

I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 4.1, in cui si riportano le seguenti informazioni:

- ✓ Acqua calda/fredda
- ✓ Tipologia di campione
- ✓ Tipologia della struttura come da classificazione linee guida
- ✓ Sierotipo identificato nel campione
- ✓ Risultato del campione non trattato (NT)
- ✓ Risultato del campione dopo trattamento termico (TT)
- ✓ Risultato del campione dopo trattamento acido (TA)
- ✓ Percentuale di TT e TA rispetto al NT

Tabella 4.1: informazioni disponibili per i campioni risultati positivi a *Legionella Pneumophila*

Campione	Acqua	Tipologia	Struttura	sierotipo	NT	TT	TA	TT% su NT	TA% su NT
C1	calda	doccia	ricettivo	2-14	80	30	140	37,5	175,0
C2	calda	rubinetto	ricettivo	2-14	1.700	4.500	2.500	264,7	147,1
C3	calda	rubinetto	servizi	2-14	2.000	720	610	36,0	30,5
C4	calda	rubinetto	servizi	1	44.000	19.000	43.000	43,2	97,7
C5	calda	ricircolo	servizi	1	5.400	2.800	3.800	51,9	70,4
C6	calda	rubinetto	servizi	1	50	40	10	80,0	20,0
C7	calda	rubinetto	sanitario	2-14	40	30	160	75,0	400,0
C8	calda	rubinetto	ricettivo	1	70	110	30	157,1	42,9
C9	n.d.	n.d.	n.d.	2-14	500	210	350	42,0	70,0
C10	calda	doccia	servizi	1	910	1.000	4.000	109,9	439,6
C11	calda	ricircolo	ricettivo	2-14	1.300	1.200	1.400	92,3	107,7
C12	calda	rubinetto	ricettivo	2-14	11.000	3.700	7.000	33,6	63,6
C13	fredda	rubinetto	servizi	1	60.000	11.000	68.000	18,3	113,3
C14	calda	ricircolo	servizi	1	24.000	1.000	25.000	4,2	104,2
C15	calda	rubinetto	sanitario	2-14	250	70	330	28,0	132,0
C16	calda	doccia	sanitario	2-14	1.000	300	200	30,0	20,0
C17	calda	doccia	sanitario	2-14	36.000	2.500	47.000	6,9	130,6
C18	calda	serbatoio	sanitario	2-14	1.000	280	1.600	28,0	160,0
C19	n.d.	n.d.	n.d.	1	40.000	22.000	33.000	55,0	82,5
C20	n.d.	n.d.	n.d.	1	54.000	12.000	30.000	22,2	55,6
C21	n.d.	n.d.	n.d.	1	5.000	740	1.000	14,8	20,0
C22	n.d.	n.d.	n.d.	1	4.900	1.200	3.600	24,5	73,5
C23	n.d.	n.d.	n.d.	1	540	290	450	53,7	83,3
C24	n.d.	n.d.	n.d.	1	640	310	350	48,4	54,7
C25	calda	doccia	servizi	2-14	1.700	1.200	1.900	70,6	111,8
C26	n.d.	ricircolo	servizi	2-14	84000	71000	76000	84,5	90,5

n.d. = non determinabile

Tutte le elaborazioni sono corredate di grafici al fine di renderne più chiara ed immediata l'interpretazione.

Iniziamo con l'analisi delle diverse tipologie di campione esaminate.

4.1 Confronto strutture di origine

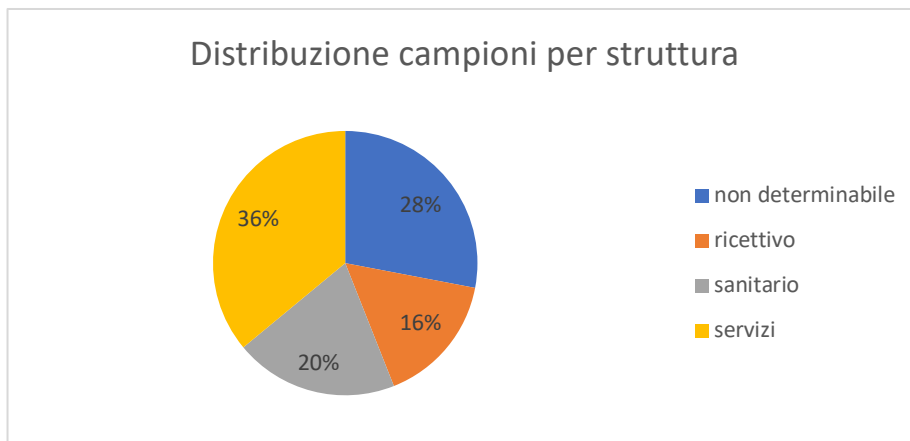


Grafico 4.1: confronto strutture di origine

Dal grafico si evince che il 36% dei campioni presi in esame provengono da servizi come centri sportivi, piscine ecc., il 20% sono campioni prelevati in strutture sanitarie e il 16% sono campioni prelevati in strutture ricettive. Il 28% non è identificabile in quanto il cliente non ha fornito le informazioni necessarie per una valutazione corretta.

4.2 Confronto acqua calda e fredda

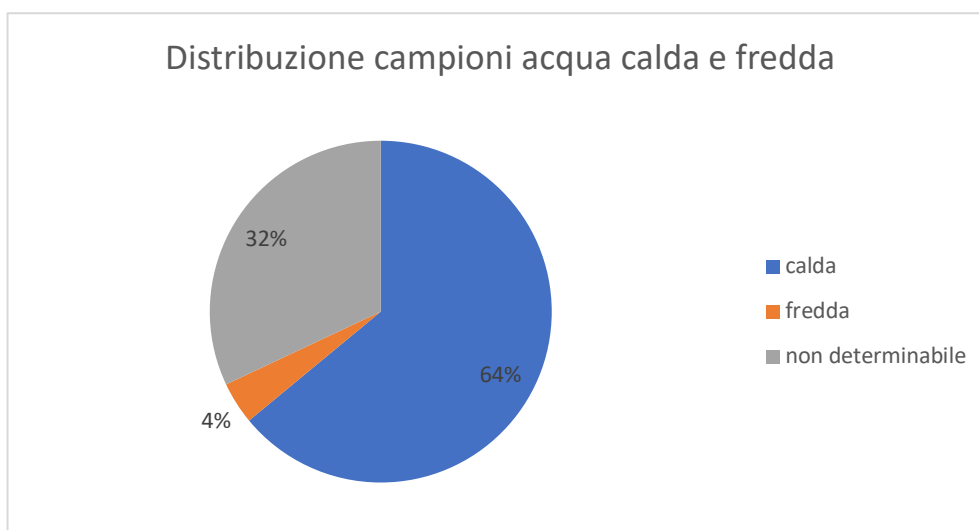


Grafico 4.2: confronto acqua calda e fredda

Come si può dedurre dal grafico il 64% dei campioni è rappresentato da acqua calda e solo il 4% da acqua fredda, mentre per il 32% non è disponibile tale informazione. Questo perché come indicato nelle linee guida la Legionella cresce più facilmente nell'acqua calda e pertanto risulta più indagata come matrice (temperatura ottimale di crescita pari a 38°C).

4.3 Confronto tipologia campioni

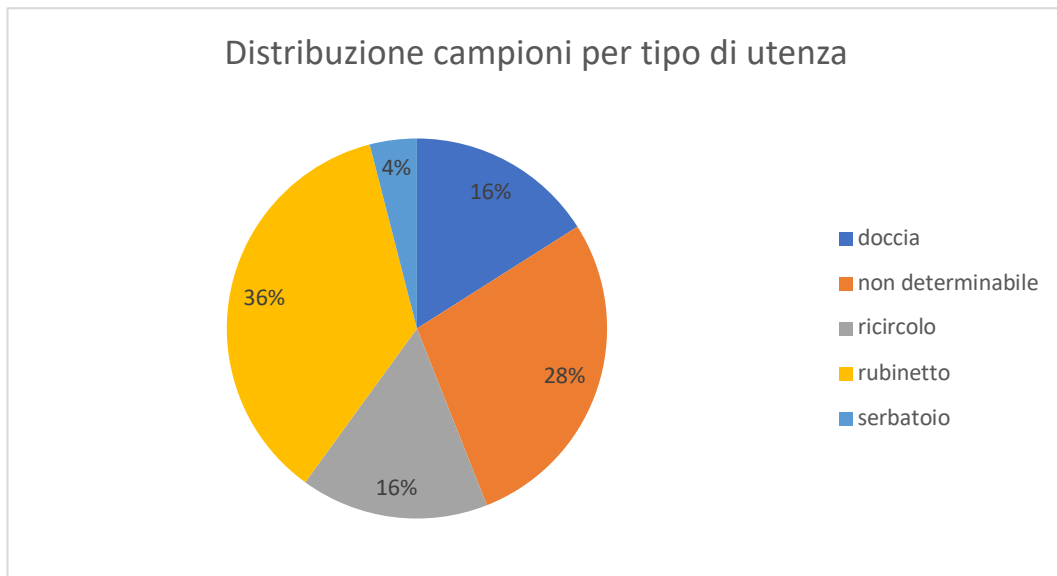


Grafico 4.3: distribuzione campioni per tipo di utenza

Per quanto riguarda la tipologia dei campioni esaminati, notiamo dal grafico che il 36% è stato raccolto dai rubinetti, il 16% dalle docce, un'ulteriore 16% dal ricircolo e il 4% da serbatoi; purtroppo una percentuale considerevole (28%) non è identificabile in quanto il cliente non ha fornito le informazioni necessarie per una valutazione corretta.

4.4 Confronto sierotipi

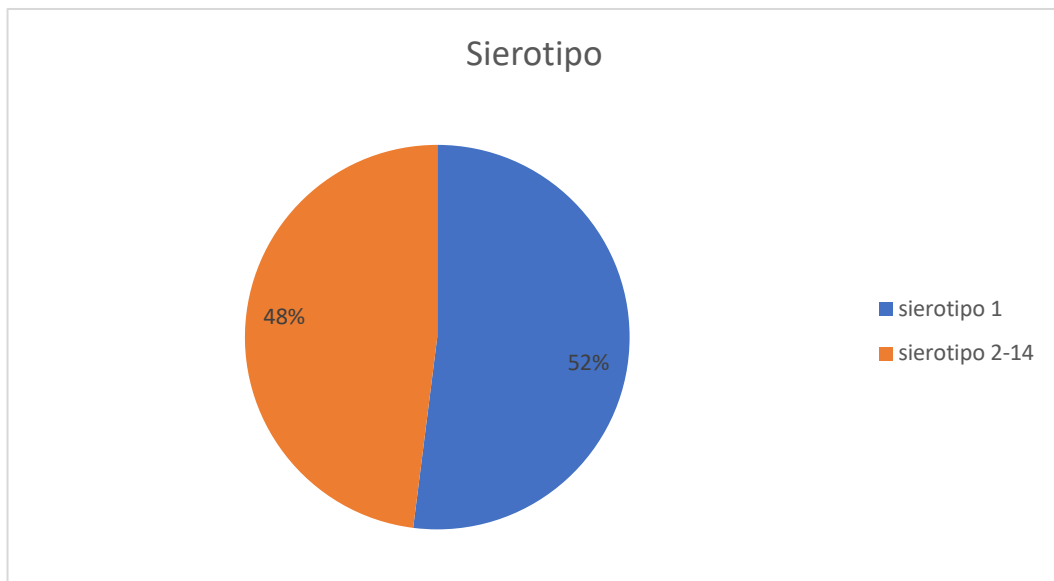


Grafico 4.4: confronto sierotipi

Passando al confronto dei sierotipi riscontrati nel 52% dei casi si tratta di *Legionella pneumophila* sierogruppo 1 e nel 48% di *Legionella pneumophila* sierogruppo 2-14. Tali valori sono in linea con quelli previsti, in quanto il sierogruppo maggiormente diffuso e responsabile della malattia è il sierogruppo 1.

4.5 Confronto tra NT TT e TA

Si riporta il grafico con l'andamento delle tre serie in UFC/1000 ml

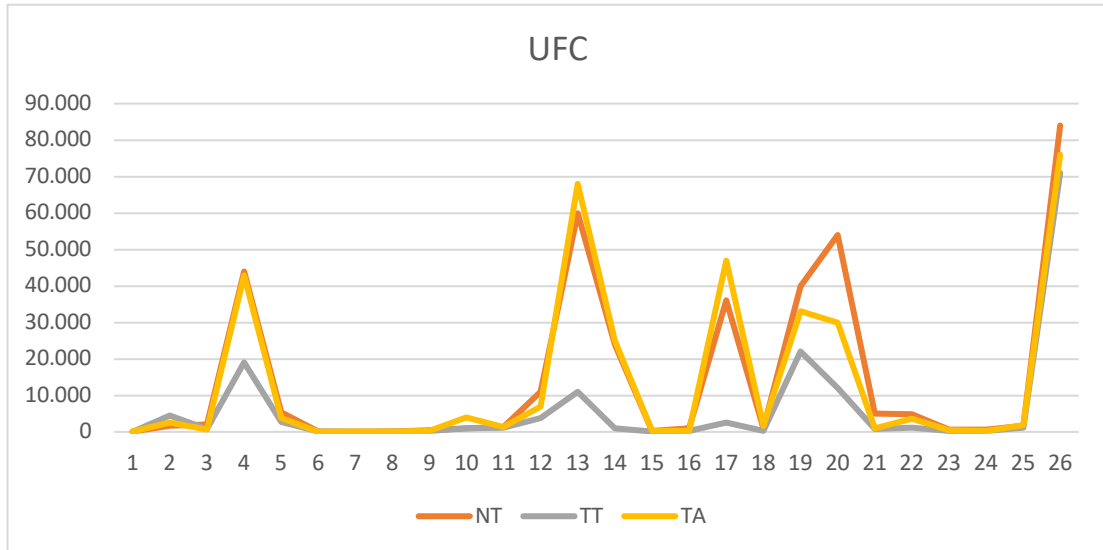


Grafico 4.5: NT, TT e TA posti a confronto

Nel grafico vengono rappresentati i tre trattamenti: non trattato (NT) in arancione, trattamento termico (TT) in grigio e trattamento acido (TA) in giallo.

Da esso si può chiaramente vedere che il non trattato e il trattamento acido sono apparentemente appaiati e talvolta sembrano sovrapporsi. Ciò sta a rappresentare che non sembra esserci differenza tra il numero di colonie rilevate nel NT e nel TA.

Il trattamento termico invece si discosta dagli altri due, con la tendenza ad avere valori sempre più bassi rispetto a NT e TA.

I dati sono stati poi normalizzati attraverso la trasformazione in logaritmo in base 10 per renderli più facilmente confrontabili tra di loro e vengono riportati nella seguente tabella.

Tabella 4.2: tabella riassuntiva dei dati normalizzati

	sierotipo	NT	TT	TA	NT log	TT log	TA log
C1	2-14	80	30	140	1,90	1,48	2,15
C2	2-14	1.700	4.500	2.500	3,23	3,65	3,40
C3	2-14	2.000	720	610	3,30	2,86	2,79
C4	1	44.000	19.000	43.000	4,64	4,28	4,63
C5	1	5.400	2.800	3.800	3,73	3,45	3,58
C6	1	50	40	10	1,70	1,60	1,00
C7	2-14	40	30	160	1,60	1,48	2,20
C8	1	70	110	30	1,85	2,04	1,48
C9	2-14	500	210	350	2,70	2,32	2,54
C10	1	910	1.000	4.000	2,96	3,00	3,60
C11	2-14	1.300	1.200	1.400	3,11	3,08	3,15
C12	2-14	11.000	3.700	7.000	4,04	3,57	3,85
C13	1	60.000	11.000	68.000	4,78	4,04	4,83
C14	1	24.000	1.000	25.000	4,38	3,00	4,40
C15	2-14	250	70	330	2,40	1,85	2,52
C16	2-14	1.000	300	200	3,00	2,48	2,30
C17	2-14	36.000	2.500	47.000	4,56	3,40	4,67
C18	2-14	1.000	280	1.600	3,00	2,45	3,20
C19	1	40.000	22.000	33.000	4,60	4,34	4,52
C20	1	54.000	12.000	30.000	4,73	4,08	4,48
C21	1	5.000	740	1.000	3,70	2,87	3,00
C22	1	4.900	1.200	3.600	3,69	3,08	3,56
C23	1	540	290	450	2,73	2,46	2,65
C24	1	640	310	350	2,81	2,49	2,54
C25	2-14	1.700	1.200	1.900	3,23	3,08	3,28
C26	2-14	84000	71000	76000	4,92	4,85	4,88

Per confrontare le diverse serie di risultati queste sono state prese in considerazione due alla volta e sono stati effettuati i seguenti test statistici: test t a due code, il coefficiente di correlazione e l'indice di regressione.

4.5.1 Confronto NT e TT

campione	NT log	TT log	TT - NT (delta)	delta - media	(delta - media)^2
C1	1,90	1,48	-0,43	-0,04	0,00
C2	3,23	3,65	0,42	0,81	0,65
C3	3,30	2,86	-0,44	-0,06	0,00
C4	4,64	4,28	-0,36	0,02	0,00
C5	3,73	3,45	-0,29	0,10	0,01
C6	1,70	1,60	-0,10	0,29	0,08
C7	1,60	1,48	-0,12	0,26	0,07
C8	1,85	2,04	0,20	0,58	0,34
C9	2,70	2,32	-0,38	0,01	0,00
C10	2,96	3,00	0,04	0,43	0,18
C11	3,11	3,08	-0,03	0,35	0,12
C12	4,04	3,57	-0,47	-0,09	0,01
C13	4,78	4,04	-0,74	-0,35	0,12
C14	4,38	3,00	-1,38	-0,99	0,99
C15	2,40	1,85	-0,55	-0,17	0,03
C16	3,00	2,48	-0,52	-0,14	0,02
C17	4,56	3,40	-1,16	-0,77	0,60
C18	3,00	2,45	-0,55	-0,17	0,03
C19	4,60	4,34	-0,26	0,13	0,02
C20	4,73	4,08	-0,65	-0,27	0,07
C21	3,70	2,87	-0,83	-0,44	0,20
C22	3,69	3,08	-0,61	-0,23	0,05
C23	2,73	2,46	-0,27	0,12	0,01
C24	2,81	2,49	-0,31	0,07	0,01
C25	3,23	3,08	-0,15	0,23	0,06
C26	4,92	4,85	-0,07	0,31	0,10
media	3,36	2,97	-0,39		

n° dati 26
s 0,4

t sp
t teorica

-5,1
2,06
se rosso TT diverso
da NT
se verde TT = NT

0,000031

**P(T<=t) due code -
ossia serie 1 = serie 2**

T = t sp

t = t teorico

La differenza tra NT e TT è statisticamente significativa (tsp non è compreso tra -2,06 e 2,06) come evidenziato dal valore ottenuto (0,000031) che rappresenta la probabilità che siano uguali; tale valore è molto basso. In questo caso viene confermata l'informazione ricavata dal grafico in UFC ovvero che il TT è diverso dal NT.

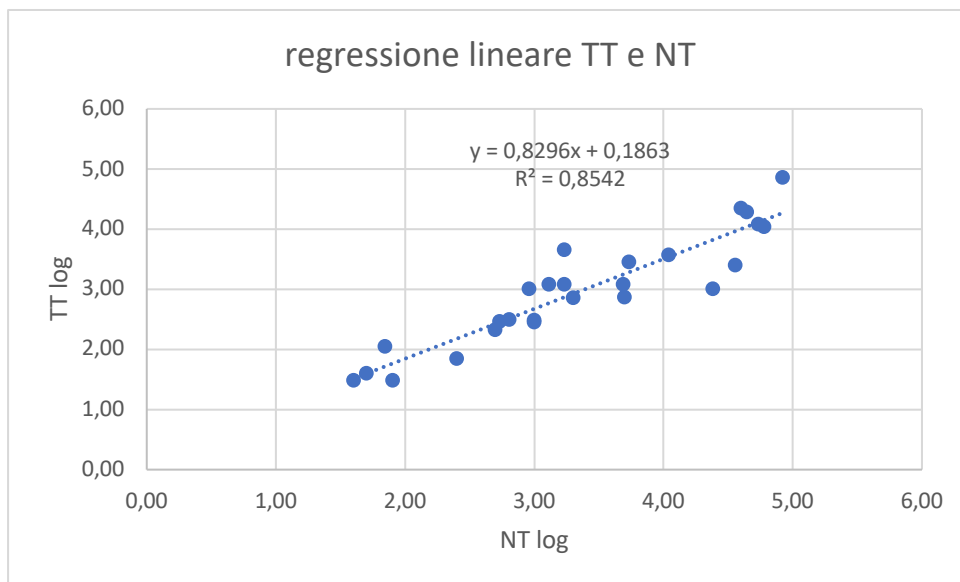
I dati ottenuti sono in seguito approfonditi con correlazione e regressione lineare:

0,92	correlazione	sr	0,08
		tsp	11,86
		t tab	2,06

se $tsp > 2,06$ rifiuto ipotesi nulla (no relazione lineare)

e accetto il contrario (evidenza statistica di una relazione lineare)

quindi esiste relazione lineare tra TT e NT.



dati regressione lineare

a

(pendenza) 0,8296

b

(intercetta) 0,1863

R^2 0,85 inferiore al 95%

La relazione lineare r tra NT e TT esiste ed è pari a 0,92

4.5.2 Confronto NT e TA

campione	NT log	TA log	TA - NT (delta)	delta - media	(delta - media)^2
C1	1,90	2,15	0,24	0,32	0,10
C2	3,23	3,40	0,17	0,25	0,06
C3	3,30	2,79	-0,52	-0,43	0,19
C4	4,64	4,63	-0,01	0,07	0,01
C5	3,73	3,58	-0,15	-0,07	0,01
C6	1,70	1,00	-0,70	-0,62	0,38
C7	1,60	2,20	0,60	0,68	0,47
C8	1,85	1,48	-0,37	-0,29	0,08
C9	2,70	2,54	-0,15	-0,07	0,01
C10	2,96	3,60	0,64	0,72	0,52
C11	3,11	3,15	0,03	0,11	0,01
C12	4,04	3,85	-0,20	-0,12	0,01
C13	4,78	4,83	0,05	0,14	0,02
C14	4,38	4,40	0,02	0,10	0,01
C15	2,40	2,52	0,12	0,20	0,04
C16	3,00	2,30	-0,70	-0,62	0,38
C17	4,56	4,67	0,12	0,20	0,04
C18	3,00	3,20	0,20	0,29	0,08
C19	4,60	4,52	-0,08	0,00	0,00
C20	4,73	4,48	-0,26	-0,17	0,03
C21	3,70	3,00	-0,70	-0,62	0,38
C22	3,69	3,56	-0,13	-0,05	0,00
C23	2,73	2,65	-0,08	0,00	0,00
C24	2,81	2,54	-0,26	-0,18	0,03
C25	3,23	3,28	0,05	0,13	0,02
C26	4,92	4,88	-0,04	0,04	0,00
media	3,36	3,28	-0,08		

n° dati 26
s 0,3

t sp
t teorica

-1,21
2,06
se rosso NT diverso
da TA
se verde NT = TA

0,236342

**P(T<=t) due code -
ossia serie 1 = serie 2**

T = t sp

t = t teorico

La differenza tra NT e TA non è statisticamente significativa (tsp è compreso tra -2,06 e 2,06) come evidenziato dal valore ottenuto (0,236342) che rappresenta la probabilità che siano uguali; tale valore è molto alto. Confermata impressione ricavata dal grafico in UFC ovvero che TA è simile al NT.

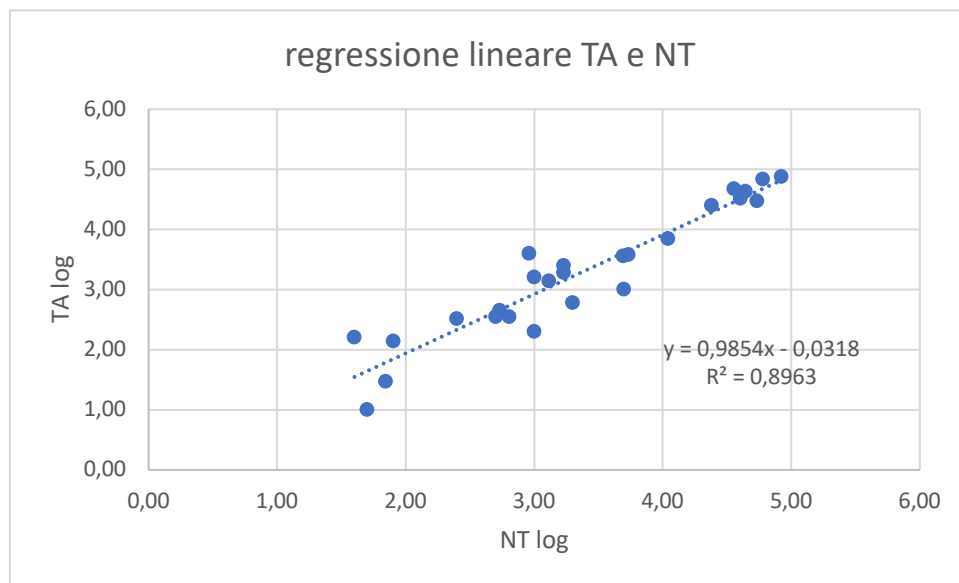
I dati ottenuti sono in seguito approfonditi con correlazione e regressione lineare:

0,95	correlazione	sr	0,07
		tsp	14,41
		t tab	2,06

se $tsp > 2,06$ rifiuto ipotesi nulla (no relazione lineare)

e accetto il contrario (evidenza statistica di una relazione lineare)

quindi esiste relazione lineare tra TA e NT



dati regressione lineare

a

(pendenza) 0,9854

b

(intercetta) -0,0318

R^2 0,90 inferiore al 95%

La relazione lineare r tra NT e TA esiste ed è pari a 0,95

4.5.3 Confronto TA e TT

campione	TT log	TA log	TA - TT (delta)	delta - media	(delta - media)^2
C1	1,48	2,15	0,67	0,36	0,13
C2	3,65	3,40	-0,26	-0,56	0,31
C3	2,86	2,79	-0,07	-0,38	0,14
C4	4,28	4,63	0,35	0,05	0,00
C5	3,45	3,58	0,13	-0,17	0,03
C6	1,60	1,00	-0,60	-0,91	0,82
C7	1,48	2,20	0,73	0,42	0,18
C8	2,04	1,48	-0,56	-0,87	0,76
C9	2,32	2,54	0,22	-0,08	0,01
C10	3,00	3,60	0,60	0,30	0,09
C11	3,08	3,15	0,07	-0,24	0,06
C12	3,57	3,85	0,28	-0,03	0,00
C13	4,04	4,83	0,79	0,49	0,24
C14	3,00	4,40	1,40	1,09	1,19
C15	1,85	2,52	0,67	0,37	0,14
C16	2,48	2,30	-0,18	-0,48	0,23
C17	3,40	4,67	1,27	0,97	0,94
C18	2,45	3,20	0,76	0,45	0,20
C19	4,34	4,52	0,18	-0,13	0,02
C20	4,08	4,48	0,40	0,09	0,01
C21	2,87	3,00	0,13	-0,17	0,03
C22	3,08	3,56	0,48	0,17	0,03
C23	2,46	2,65	0,19	-0,11	0,01
C24	2,49	2,54	0,05	-0,25	0,06
C25	3,08	3,28	0,20	-0,11	0,01
C26	4,85	4,88	0,03	-0,28	0,08
media	2,97	3,28	0,30		

n° dati 26
s 0,5

t sp
t teorica

3,25
2,06
se rosso TT diverso
da TA
se verde TT = TA

0,003278

**P(T<=t) due code -
ossia serie 1 = serie 2**

T = t sp

t = t teorico

La differenza tra TA e TT è statisticamente significativa (tsp non è compreso tra -2,06 e 2,06) come evidenziato dal valore ottenuto (0,003278) che rappresenta la probabilità che siano uguali; tale valore è molto basso. Confermata impressione ricavata dal grafico in UFC ovvero che TT è diverso dal TA.

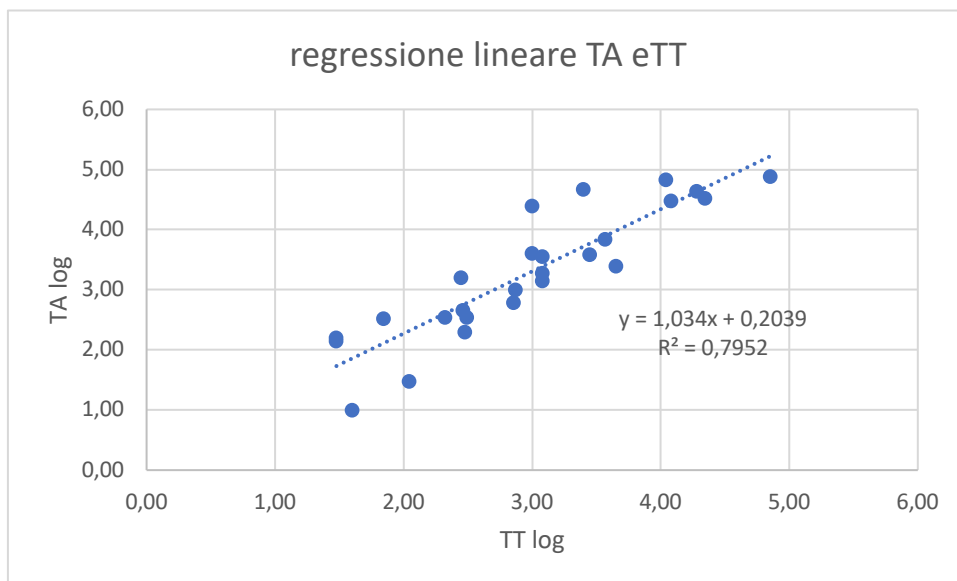
I dati ottenuti sono in seguito approfonditi con correlazione e regressione lineare:

0,89	correlazione	sr	0,09
		tsp	9,65
		t tab	2,06

se $tsp > 2,06$ rifiuto ipotesi nulla (no relazione lineare)

e accetto il contrario (evidenza statistica di una relazione lineare)

quindi esiste relazione lineare tra TA e TT



dati regressione lineare

a (pendenza) 1,034

b (intercetta) 0,2039

R^2 0,80 inferiore al 95%

La relazione lineare r tra TA e TT esiste ed è pari a 0,89

Tabella 4.3: Tabella riassuntiva esiti test statistici applicati

		NT e TT	NT e TA	TA e TT
Test t	t sp	-5,1	-1,21	3,25
	t tab	2,06	2,06	2,06
	differenza statisticamente significativa	sì	no	sì
	Probabilità che serie 1 = serie 2	< 1%	24%	< 1%
Correlazione	r	0,92	0,95	0,89
	t ₁ sp (r/sr)	11,86	14,41	9,65
	t ₁ tab	2,06	2,06	2,06
	evidenza statistica di relazione lineare	sì	sì	sì
	relazione lineare ≥ 0,95	no	sì	no
Regressione lineare	a (pendenza)	0,8296	0,9854	1,034
	b (intercetta)	0,1863	-0,0318	0,2039
	R ²	0,85	0,90	0,80
	R² ≥ 0,95	no	no	no

I test statistici sembrano confermare la prima valutazione soggettiva, basata sull'osservazione dell'andamento dei dati in UFC rappresentati nel grafico iniziale, come di seguito dettagliato.

Risultati test t

- Nel caso di non trattato (NT) e trattamento termico (TT) il test evidenzia una differenza statisticamente significativa tra le due serie ($t_{sp} \leq -t_{tab}$) quindi è statisticamente accettabile che siano diversi, come già ipotizzato;
- Nel caso di non trattato (NT) e trattamento acido (TA) il test non evidenzia una differenza statisticamente significativa tra le due serie ($-t_{tab} \leq t_{sp} \leq +t_{tab}$) quindi è statisticamente accettabile che siano uguali, come già ipotizzato;

- Nel caso di trattamento acido (TA) e trattamento termico (TT) il test evidenzia una differenza statisticamente significativa tra le due serie ($t_{sp} > +t_{tab}$) quindi è statisticamente accettabile che siano diversi, come già ipotizzato;

Risultati test di correlazione

In tutti i casi il coefficiente di correlazione r è risultato essere significativo, indicando una evidenza statistica di relazione lineare (ma non necessariamente di causa ed effetto). Solo nel caso della coppia NT e TA esso è risultato $\geq 0,95$, indice di una maggior correlazione (correlazione totale $r=1$)

Risultati test di regressione lineare

In tutti i casi è stato possibile calcolare la regressione lineare in quanto il coefficiente r è risultato essere significativo. I valori di a (pendenza della retta) e b (intercetta) sono riportati in tabella 4.3.

Il valore di R^2 è stato utilizzato per valutare il grado di accordo dei dati al modello calcolato: per tutti è risultato $< 0,95$, ma nel caso della coppia NT e TA si è registrato il valore più elevato (pari a $0,90$) indice di una maggior significatività rispetto alle altre coppie (accordo totale $R^2 = 1$).

In letteratura sono disponibili numerosi studi recenti volti a confrontare il metodo di rilevazione della Legionella tramite PCR rispetto al metodo colturale. Pochi sono invece i lavori focalizzati sul confronto tra l'efficacia del trattamento termico rispetto al trattamento acido, se non quelli citati nel metodo ISO 11731 - oggetto del presente lavoro di tesi- e nelle Linee guida per il controllo e la prevenzione della legionellosi prese a riferimento. Queste fonti bibliografiche suggeriscono che il trattamento termico da valori più bassi in quanto si consiglia di effettuarlo solo qualora gli altri trattamenti non siano interpretabili.

Uno studio di Maio et al., 2020, seppur volto a confrontare due diversi metodi di ricerca della Legionella, evidenzia una maggior efficacia nel rilevare il batterio dopo trattamento acido rispetto al trattamento termico. In aggiunta, uno studio svolto presso l'Università di Graz in Austria di Reinthaler et al., 1993, afferma che una maggiore riduzione dei microorganismi che potrebbero interferire con la Legionella e il maggior numero di colonie di Legionella si riscontrano dopo trattamento acido. I risultati ottenuti nel presente lavoro di tesi confermano quanto riportato nella

bibliografia sopracitata ed hanno permesso al Laboratorio Ecoopera di approfondire l'efficacia dei trattamenti su campioni reali.

5. CONCLUSIONI

Ripercorriamo le fasi dello studio svolto nel presente lavoro di tesi, che ha avuto come oggetto di ricerca la *Legionella spp.*

È stata analizzata la *Legionella spp.* presente nelle acque idrosanitarie con il metodo ISO 11731:2017, prendendo in considerazione campioni di acqua prelevati in luoghi differenti e secondo quanto indicato da specifici piani di campionamento. Questi prevedono di indagare maggiormente l'acqua calda e le utenze finali, in cui effettivamente il batterio è stato maggiormente riscontrato nel presente lavoro.

I campioni sono stati esaminati tramite la filtrazione e la posa diretta della membrana su piastra (rif. 8.4.3.1). Questa procedura prevede l'analisi dei campioni tal quali (NT), dopo trattamento termico (TT) e dopo trattamento acido (TA). I risultati sono stati poi confrontati per capire se vi fossero differenze significative o meno.

Su cento campioni analizzati le valutazioni statistiche finali sono state effettuate solo su 26 in quanto gli altri sono risultati negativi o con uno dei trattamenti non interpretabile. Attraverso le analisi statistiche effettuate è emerso che è sempre significativa la differenza quando viene considerato il trattamento termico (NT e TT e TA e TT risultato sempre più basso) mentre nel caso di NT e TA si può affermare che i risultati sono statisticamente uguali. Per questa coppia inoltre i valori di correlazione lineare e regressione lineare sono i più significativi ($> 0,90$).

Dai dati ottenuti quindi si può affermare che i risultati sembrano in linea con il metodo ISO 11731:2017 (rif. 8.4.3.1), che indica il trattamento termico come facoltativo e da applicare nel momento in cui i campioni analizzati non trattati e dopo trattamento acido non sono leggibili.

6. BIBLIOGRAFIA

- “Legionella and the prevention of legionellosis” World Health Organization (WHO) 2007 ISBN 92 4 156297 8
- “Linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi” Conferenza Stato-Regioni del 7 maggio 2015
- ISO 11731:2017 “Water Quality – Enumeration of *Legionella*”
- Beauté, J., Sandin, S., de Jong, B., Hallström, L. P., Robesyn, E., Giesecke, J., & Sparén, P. (2019). Factors associated with Legionnaires’ disease recurrence in hotel and holiday rental accommodation sites. *Eurosurveillance*, 24(20). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.20.1800295>
- Boccia, S., Laurenti, P., Leoncini, E., Amore, R., Vincenti, S., Arzani, D., Berloco, F., Boninti, F., Bruno, S., Celani, F., Damiani, G., Di Giannantonio, P., Moscato, U., Posteraro, B., Sezzatini, R., Vecchioni, A., Wachocka, M., Ricciardi, W., Quaranta, G., & Ficarra, M. G. (2015). Comparison of conventional culture methods and quantitative real-time PCR methods for the detection of *Legionella pneumophila* in water samples in a large University teaching hospital in Rome, Italy. *Igiene e Sanità Pubblica*, 71(6), 569–576.
- Edelstein, P. H., & Roy, C. R. (2014). Legionnaires’ Disease and Pontiac Fever. In *Mandell, Douglas, and Bennett’s Principles and Practice of Infectious Diseases* (Eighth Ed, Vol. 2). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00234-4>
- Girolamini, L., Salaris, S., Lizzadro, J., Mazzotta, M., Pascale, M. R., Pellati, T., & Cristino, S. (2020). How molecular typing can support legionella environmental surveillance in hot water distribution systems: A hospital experience. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(22), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijerph17228662>
- Karia, K., Yui, S., Muzslay, M., & Ali, S. (2023). Concordance between IDEXX Legiolert® (liquid culture assay) and plate culture (ISO 11731:2017) for the detection and quantification of *Legionella pneumophila* in water samples. *Journal of Hospital Infection*, xxxx. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2023.10.019>
- Rota, M. C., Caporali, M. G., Giannitelli, S., Urciuoli, R., Scaturro, M., & Ricci, M. L. (2023). La sorveglianza nazionale della legionellosi: risultati relativi all’anno

2022. *Boll Epidemiol Naz*, 4(1), 25–32. <https://doi.org/10.53225/BEN>

- Maio, S. Di, Messina, G., Burgassi, S., Cardaci, R., Amodeo, D., Marco, F. De, Serafini, A., & Lenzi, D. (2020). Rapid detection of Legionella spp in water samples by ScanVIT method: comparison of acid vs heat treatment. *Annali Di Igiene Medicina Preventiva e Di Comunita*, 32(6), 635–647. <https://doi.org/10.7416/ai.2020.2385>
- Reinthaler, F. F., Sattler, J., Schaffler-Dullnig, K., Weinmayr, B., & Marth, E. (1993). Comparative study of procedures for isolation and cultivation of Legionella pneumophila from tap water in hospitals. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(5), 1213–1216. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.5.1213-1216.1993>

SITOGRAFIA

- <https://www.epicentro.iss.it/>
- <https://legionella.it/>
- <https://www.salute.gov.it/>
- <https://www.issalute.it/>
- <https://www.who.int/>
- <https://paolapozzolo.it/>

