Linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi

Gruppo di lavoro **5**
GLOSSARIO **6**
PREMESSA **9**
1. ASPETTI GENERALI **10**
1.1. Introduzione 10
1.2. Fonti di infezione, modalità di trasmissione e fattori di rischio 10
1.3. Frequenza della malattia 13
1.4. Sintomatologia 13
1.5. Diagnosi di laboratorio: ricerca di *Legionella* in campioni di provenienza umana 14
Metodo colturale 16
Rilevazione dell'antigene urinario 16
Metodi sierologici 18
Immunofluorescenza diretta (DFA) 19
Amplificazione di geni specifici mediante PCR 19
1.6 Ricerca di Legionella in campioni di provenienza ambientale 20
Metodo colturale 20
Real-Time PCR 20
1.7 Terapia 21
2. SORVEGLIANZA E INDAGINE EPIDEMIOLOGICA **25**
2.1 La sorveglianza epidemiologica 25
Obiettivi 25
Definizione di caso 25
Il sistema di notifica 26
Il sistema di sorveglianza speciale: il registro nazionale della legionellosi 27
La sorveglianza internazionale della legionellosi nei viaggiatori 27
2.2. Indagine epidemiologica 30
Casi isolati 30
Cluster 31
3. PROTOCOLLO DI CONTROLLO DEL RISCHIO LEGIONELLOSI **32**
3.1. Introduzione 32
3.2. Valutazione e gestione del rischio nelle strutture turistico-recettive 33
Valutazione del rischio 33
Periodicità della valutazione del rischio 34
Gestione del rischio 34
3.3. Valutazione e gestione del rischio negli stabilimenti termali 39
Valutazione del rischio 40
Periodicità della valutazione del rischio 40
Gestione del rischio 40
3.4. Valutazione e gestione del rischio nelle strutture sanitarie 42
Valutazione del rischio 42
Periodicità della valutazione del rischio 45
Gestione del rischio 45

Prevenzione della legionellosi correlata a procedure assistenziali 48
Diagnosi di legionellosi e sorveglianza attiva 49
Comunicazione e formazione 51
4. METODI DI PREVENZIONE E CONTROLLO DELLA CONTAMINAZIONE DEL SISTEMA IDRICO 53
5. INDICAZIONI PER LA PROGETTAZIONE, LA REALIZZAZIONE E LA GESTIONE DEGLI IMPIANTI 54
5.1. Introduzione 54
5.2. Impianti idro-sanitari 54
5.3. Impianti aeraulici 55
Prese d'aria esterna 55
Filtri 55
Sistemi di umidificazione 56
Batterie di scambio termico 56
Silenziatori 56
Canalizzazioni 56
5.4. Impianti di raffreddamento a torri di evaporative e condensatori evaporativi 57
5.5. Gestione degli impianti idro-sanitari 58
5.6. Gestione degli impianti aeraulici 59
Sanificazione dell'impianto 60
5.7. Gestione degli impianti di raffreddamento a torri evaporative o a condensatori evaporativi 61
5.8. Gestione degli impianti a servizio delle piscine e degli idromassaggi alimentati con acqua dolce 62
5.9. Documentazione degli interventi 62
5.10. Provvedimenti di emergenza in presenza di cluster 63
Disattivazioni di impianti. 63
Sospensione dell'attività della struttura interessata. 63
6. RISCHIO LEGIONELLOSI ASSOCIATO AD ATTIVITÀ PROFESSIONALE 64
6.1. Introduzione 64
6.2. Il rischio per operatori sanitari 64
Settore odontoiatrico 66
Il rischio per altre categorie di lavoratori 67
BIBLIOGRAFIA 68
Allegato 1:Specie e sierogruppi di Legionella 76
Allegato 2: Ricerca di Legionella in campioni di origine umana 78
Misure di sicurezza 78
Prelievo, trasporto e conservazione 78
Metodo colturale 79
Strumenti, materiali, terreni e reagenti 79
Procedimento 79
Immunofluorescenza diretta (DFA) 80
Procedimento 81
Preparazione dei reagenti 82
Strumenti, materiali e reagenti 83

Procedimento ... 83
Determinazione dell'antigene urinario ... 84
Allegato 3:Campionamento di matrici ambientali per la ricerca di Legionella ... 85
Misure di sicurezza ... 85
Campionamento ... 87
Impianti idrosanitari ... 88
Impianti di raffreddamento a torri evaporative/condensatori evaporativi ... 88
Modalità di prelievo ... 88
Trasporto e conservazione ... 89
Allegato 4: Ricerca e quantificazione di Legionella in campioni ambientali ... 91
Misure di sicurezza ... 91
Strumenti e Materiali ... 91
Terreni e diluenti ... 92
Modalità di preparazione ... 92
Procedimento per campioni ambientali a matrice acquosa ... 94
Concentrazione per filtrazione ... 94
Concentrazione per centrifugazione ... 97
Procedimento per campioni ambientali a matrice non acquosa ... 97
Depositi o sedimenti. ... 97
Incrostazioni ... 97
Tamponi ... 97
Filtri ... 97
Espressione dei risultati ... 98
Campioni ambientali a matrice acquosa ... 98
Allegato 5: Identificazione e conservazione di Legionella ... 101
Misure di sicurezza ... 101
Strumenti, reagenti e Terreni ... 101
Prova differenziale preliminare. ... 102
, definitiva. ... 103
Congelamento e conservazione dei ceppi ... 103
Allegato 6:Ricerca di Legionella in campioni ambientali mediante Real-Time PCR ... 105
Aspetti generali ... 105
Aree di lavoro ... 105
Campionamento ... 105
Concentrazione ... 106
Decontaminazione ... 106
Estrazione di DNA genomico ... 106
Controllo di inibizione ... 106
Amplificazione di DNA mediante qPCR ... 107
Allegato 7: Revisione Circolare 400.2/9/5708 del 29/12/93 ... 109
Allegato 8: Elenco Dei Laboratori Regionali di Riferimento per la Legionellosi ... 110
Allegato 9: Modulo A ELDSnet ... 119
Allegato 10: Modulo B ELDSnet ... 120
Allegato 11: Questionario per l'indagine di focolai epidemici ... 121
Allegato 12: Lista di controllo per il sopralluogo di valutazione del rischio legionellosi .. 122

Allegato 13: Metodi di prevenzione e controllo della contaminazione del sistema idrico. 136
Misure a breve termine..... 136
Misure a lungo termine 136
Filtrazione al punto di utilizzo 136
Trattamento Termico..... 136
Irraggiamento UV 138
Clorazione 139
Iperclorazione continua 139
Disinfezione con biossido di cloro 140
Ozonizzazione..... 140
Disinfezione con monoclorammina..... 141
Ionizzazione rame-argento..... 141
Disinfezione con perossido di idrogeno e ioni argento 142
Disinfezione con acido peracetico..... 142

GRUPPO DI LAVORO

Dott. Roberto Cagarelli, Dirigente Medico, Assessorato politiche per la salute, Servizio Sanità Pubblica, Regione Emilia Romagna.

Dott.ssa Anna Caraglia, Dirigente Medico ufficio V della D.G. Prevenzione del Ministero, della Salute.

Ing. Sergio La Mura, Professore a contratto Impianti Tecnici, Politecnico di Milano

Ing. Giammarco Mele, Consulente – Employment Research Institute dell'Università di Edinburgh Napier.

Dott. Massimo Ottaviani, Dirigente di Ricerca Dipartimento Ambiente e connessa Prevenzione primaria, Istituto Superiore di Sanità.

Dott.ssa Maria Grazia Pompa, Direttore ufficio V della D.G. Prevenzione del Ministero della Salute.

Dott.ssa Maria Luisa Ricci, Primo Ricercatore Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità.

Dott.ssa Maria Cristina Rota, Primo Ricercatore Centro Nazionale Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute, Istituto Superiore di Sanità.

Dott.ssa Maria Scaturro, Ricercatore Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, Istituto Superiore di Sanità.

Dott. Mario Venditti, Professore Associato di Malattie Infettive, Università "la Sapienza". Responsabile della Unità di Programma "Clinica delle Infezioni Ospedaliere" del Policlinico Umberto I di Roma,

Dott. Enrico Veschetti, Ricercatore Dipartimento Ambiente e connessa Prevenzione primaria, Istituto Superiore di Sanità.

GLOSSARIO

Aerosol: in questo documento è definito come una sospensione di particelle costituite da minuscole goccioline di acqua, in genere con diametro interno < 5 µm, che possono contenere *Legionella* ed essere inalate in profondità nei polmoni.

Anticorpo: sostanza che si forma nel sangue e distrugge o neutralizza le tossine o altri componenti microbici noti in genere come antigeni. Gli anticorpi si formano come conseguenza dell'introduzione nel corpo di un antigene di cui sono antagonisti.

Aria condizionata: un sistema di trattamento dell'aria in cui temperatura, umidità e purezza dell'aria sono controllate entro limiti determinati.

Aspirazione: vedi microaspirazione.

Batteri: organismi microscopici, unicellulari o, più raramente, pluricellulari.

Biocida o disinfettante: sostanza capace di distruggere o inattivare irreversibilmente (in relazione alla concentrazione utilizzata ed al tempo di contatto) i microrganismi, riducendo il loro numero.

Biocida ossidante: è un disinfettante in grado di ossidare la materia organica (materiale cellulare, proteine che derivano dalla morte di popolazioni microbiche, ecc). I più comuni agenti ossidanti sono il cloro, il bromo, il perossido di idrogeno e l'ozono.

Biocida non ossidante: è un disinfettante (es. glutaraldeide) che agisce con meccanismi diversi dall'ossidazione, ad esempio attraverso l'interferenza con il metabolismo cellulare.

Biofilm: è una aggregazione complessa di microrganismi contraddistinta dalla secrezione di una matrice adesiva e protettiva, caratterizzata spesso anche da adesione ad una superficie, sia di tipo biologico che inerte, eterogeneità strutturale, interazioni biologiche complesse ed una matrice extracellulare di sostanze polimeriche, spesso di carattere polisaccaridico.

Condensatore evaporativo: è un dispositivo che, attraverso uno scambio di calore, permette la condensazione di un gas caldo che scorre all'interno di un circuito chiuso le cui tubazioni sono esternamente irrorate con acqua che, evaporando, permette la condensazione del gas caldo. L'evaporazione è agevolata da un flusso d'aria in direzione opposta al flusso d'acqua di raffreddamento.

Disinfezione: è un processo irreversibile operato con metodi chimici o fisici che distrugge o inattiva micro-organismi e ne riduce il numero.

Erogatori sentinella: rubinetti selezionati, di solito il primo e l'ultimo su un sistema di ricircolo dell'acqua calda, per il monitoraggio di routine. Per i sistemi di acqua fredda (o sistemi senza ricircolo dell'acqua calda), i rubinetti più vicini e più lontani dal serbatoio di deposito o il punto nel quale l'acqua entra nell'edificio. La scelta di rubinetti sentinella può anche includere altri rubinetti che possono rappresentare un rischio particolare.

Filtro HEPA: con tale termine (dall'inglese *High EfficiencyParticulate Air filter*) si indica un particolare sistema di filtrazione ad elevata efficienza di fluidi (liquidi o gas). È composto da foglietti filtranti di microfibre (generalmente in borosilicato) assemblati in più strati, separati da setti in alluminio. I foglietti filtranti in microfibra hanno il compito di bloccare il particolato presente in sospensione nel fluido da trattare. Le particelle solide possono essere infatti nocive per la salute umana o possono pregiudicare la qualità del prodotto finale che si desidera ottenere. I filtri HEPA fanno parte della categoria dei cosiddetti "filtri assoluti", a cui appartengono anche i filtri ULPA (*Ultra LowPenetration Air*). Il termine "filtri assoluti" è giustificato dal fatto che tali dispositivi mostrano un'elevata efficienza di ritenzione, compresa tra l'85% (H10) e il 99,995% (H14) per gli HEPA e tra il 99,9995% (U15) e il 99,999995% (U17) per gli ULPA.

Inalazione: introduzione con l'inspirazione, nell'apparato respiratorio di sostanze volatili o liquidi aerosolizzati.

Inibitori di corrosione: prodotti chimici che proteggono i metalli dalla corrosione mediante: (i) promozione di un film sottile di ossido di metallo (passivazione) ad opera di inibitori anodici; (ii) formazione di una barriera fisica (pellicola sottile) per deposizione controllata.

Inibitori del calcare: sostanze chimiche usate per controllare la formazione del calcare.

Microaspirazione: inalazione di secrezioni oro-faringee nell'albero bronchiale. E' un meccanismo di per sé fisiologico, sempre presente in noi anche se non ce ne accorgiamo (per esempio come succede durante il sonno), ma che tende ad accentuarsi in caso di turbe della coscienza e della deglutizione.

Microrganismo: un organismo di dimensioni microscopiche come i batteri, funghi, protozoi e virus.

NDMA: N - Nitrosodimetilammina.

Organoalogenati: vengono indicati come **composti** organoalogenati i composti organici che contengono nella loro molecola almeno un atomo di alogeno (bromo, cloro, fluoro iodio).

Pastorizzazione: trattamento termico effettuato a temperatura elevata per un determinato tempo al fine di distruggere i patogeni presenti nell'acqua o in un alimento.

Real-Time PCR: è un metodo di amplificazione del DNA (reazione a catena della polimerasi o PCR) che può essere rilevata in tempo reale. Il metodo permette anche la quantificazione delle molecole di DNA (q-PCR) presenti nel campione.

Stagnazione: condizione in cui l'acqua cessa di fluire all'interno di un sistema favorendo, nel tempo, la crescita microbica.

Torre evaporativa o torre di raffreddamento: è un dispositivo di dissipazione del calore che estrae calore nell'atmosfera attraverso il raffreddamento di un flusso di acqua ad una temperatura inferiore. La dissipazione del calore in una torre di raffreddamento avviene per "evaporazione", in quanto una quota dell'acqua da raffreddare evapora in un flusso di aria in movimento contrario, al fine di fornire un raffreddamento significativo alla parte rimanente del flusso d'acqua.

THM: trialometani.

Valutazione del rischio: procedura volta ad identificare e valutare il rischio di legionellosi in sorgenti d'acqua (impianti idrici, torri di raffreddamento, ecc.) in edifici o siti industriali e determinare le azioni necessarie per ridurlo.

Valvola termostatica di miscelazione (TMV): erogatore in cui la temperatura in uscita è pre-selezionata e controllata automaticamente dalla valvola che rilascia l'acqua ad una temperatura di solito compresa tra i 42 - 44°C.

PREMESSA

Le “Linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi” pubblicate nel 2000, sono state il primo documento nazionale finalizzato a fornire agli operatori sanitari informazioni aggiornate sulla legionellosi, sulle diverse fonti di infezione, sui metodi diagnostici e di indagine epidemiologica ed ambientale. In tale documento era compresa la revisione della Circolare 400.2/9/5708 del 29.12.93 "Sorveglianza delle legionellosi" per l'aggiornamento della scheda di sorveglianza.

Il 4 febbraio 2005 è stato pubblicato in Gazzetta Ufficiale N.28 un accordo tra il Ministero della Salute e le Regioni e le Province autonome di Trento e di Bolzano, avente ad oggetto “Linee guida recanti indicazioni sulla legionellosi per i gestori di strutture turistico-recettive e termali”. Tale accordo è stato elaborato al fine di offrire ai direttori di strutture turistico-recettive e termali gli elementi di giudizio per la valutazione del rischio legionellosi in dette strutture e un insieme di suggerimenti tecnico-pratici, basati sulle evidenze scientifiche più aggiornate per ridurre al minimo tale rischio.

Inoltre, come riportato nel D. Lgs 81/2008 e successive modifiche e integrazioni, il rischio di esposizione a *Legionella* in qualsiasi ambiente di lavoro richiede l’attuazione di tutte le misure di sicurezza appropriate per esercitare la più completa attività di prevenzione e protezione nei confronti di tutti i soggetti presenti considerando che al Titolo X del suddetto D. Lgs 81/2008 la *Legionella* è classificata al gruppo 2 tra gli agenti patogeni.

Le misure di sicurezza si dovranno realizzare a seguito del procedimento di valutazione del rischio, indicato sempre al menzionato Titolo X e si dovranno attuare in conformità ai disposti del Titolo I (del citato Decreto Legislativo) riferendosi a quanto riportato negli Artt. 15 e 18.

L’elaborazione del documento si è basata sulle conoscenze presenti nella letteratura scientifica internazionale e ha tratto spunto anche da quanto riportato nelle linee guida prodotte a livello internazionale (WHO), europeo (EWGLI) e nazionale/regionale (Regione Emilia Romagna).

Con il presente documento si intende quindi riunire, aggiornare e integrare in un unico testo tutte le indicazioni riportate nelle precedenti linee guida nazionali e normative, pertanto esso le sostituisce integralmente.

1. ASPETTI GENERALI

1.1. Introduzione

Le legionelle sono presenti negli ambienti acquatici naturali e artificiali: acque sorgive, comprese quelle termali, fiumi, laghi, fanghi, ecc. Da questi ambienti esse raggiungono quelli artificiali come condotte cittadine e impianti idrici degli edifici, quali serbatoi, tubature, fontane e piscine, che possono agire come amplificatori e disseminatori del microrganismo, creando una potenziale situazione di rischio per la salute umana (Declerck et al., 2007; Fliermans et al., 1981).

"Legionellosi" è la definizione di tutte le forme morbose causate da batteri Gram-negativi aerobi del genere *Legionella*. Essa si può manifestare sia in forma di polmonite con tasso di mortalità variabile tra 10-15%, sia in forma febbrile extrapolmonare o in forma subclinica. La specie più frequentemente coinvolta in casi umani è *L. pneumophila* anche se altre specie sono state isolate da pazienti con polmonite (Allegato 1). Nel presente documento, i termini "legionellosi" e "Malattia dei Legionari", vengono usati come sinonimo per indicare le forme morbose gravi (polmoniti) causate da microrganismi del genere *Legionella.*

Dopo la prima identificazione nel 1976 (Fraser et al., 1977; McDade et al., 1979), si è osservato un po' ovunque nei Paesi industrializzati un notevole incremento del numero di casi e questo può essere attribuito sia al miglioramento degli strumenti diagnostici disponibili e alla maggiore sensibilità dei clinici nei confronti della malattia, sia all'aumento delle occasioni di esposizione all'agente eziologico dovuto all'incremento del turismo, della frequentazione di centri-benessere e alla sempre più diffusa installazione di impianti di condizionamento centralizzati negli ambienti ad uso collettivo, dotati di torri di raffreddamento e/o condensatori evaporativi.

Essendo il microrganismo ubiquitario, la malattia può manifestarsi con epidemie dovute ad un'unica fonte con limitata esposizione nel tempo e nello spazio all'agente eziologico, oppure con una serie di casi indipendenti in un'area ad alta endemia o con casi sporadici senza un evidente raggruppamento temporale o geografico. Focolai epidemici si sono ripetutamente verificati in ambienti collettivi a residenza temporanea, come ospedali o alberghi, navi da crociera, esposizioni commerciali, ecc. I casi di polmonite da *Legionella* di origine comunitaria si manifestano prevalentemente nei mesi estivo-autunnali, mentre quelli di origine nosocomiale non presentano una particolare stagionalità.

1.2. Fonti di infezione, modalità di trasmissione e fattori di rischio

Il genere *Legionella* comprende 61 diverse specie (sottospecie incluse) e circa 70 sierogruppi (Allegato 1), ma non tutte sono state associate a casi di malattia nell'uomo. *Legionella pneumophila* è la specie più frequentemente rilevata nei casi diagnosticati (Fields et al., 2002) ed è costituita da 16 sieropgruppi di cui *Legionella pneumophila* sierogruppo 1, responsabile dell'epidemia di Filadelfia, è causa del 95% delle infezioni in Europa e dell'85% nel mondo. Anche in Italia l'analisi della distribuzione di specie e sierogruppi isolati nel nostro territorio ha confemato la prevalenza di *Legionella pneumophila* ed in particolare del sierogruppo 1 nei casi di malattia (Fontana et al., 2014).

Non è nota la dose infettante per l'uomo. Neppure si conoscono le ragioni della diversa virulenza nelle differenti specie e sierogruppi di *Legionella* che tuttavia potrebbero essere attribuite alla idrofobicità di superficie, alla stabilità nell'aerosol e alla capacità di crescere all'interno delle amebe.

Non è noto neppure lo stato fisiologico di *Legionella* che causa l'infezione, ma esso può includere sia la fase stazionaria di crescita sia quella logaritmica, come pure le cosiddette *spore-like forms*.

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

La legionellosi viene normalmente acquisita per via respiratoria mediante inalazione, aspirazione o microaspirazione di aerosol contenente *Legionella*, oppure di particelle derivate per essiccamento.

Le goccioline si possono formare sia spruzzando l'acqua che facendo gorgogliare aria in essa, o per impatto su superfici solide. La pericolosità di queste particelle di acqua è inversamente proporzionale alla loro dimensione. Gocce di diametro inferiore a 5µ arrivano più facilmente alle basse vie respiratorie. Sono stati inoltre segnalati in letteratura casi di legionellosi acquisita attraverso ferita (Brabender et al., 1983; Lowry et al., 1991; Lowry and Tompkins, 1993). Non è mai stata dimostrata la trasmissione interumana della malattia.

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

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

In Italia negli ultimi venti anni gli eventi epidemici più rilevanti sono stati causati da torri di raffreddamento (Castellani et al, 1997;, Rota et al. 2005; Venezia, dati non pubblicati) o da impianti idrici di strutture turistico ricettive (Rota et al.2011) o probabilmente da più sorgenti (torri di raffreddamento e/o impianti idrici di abitazioni) Scaturro et al. 2014.

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

Fattori predisponenti la malattia sono l'età avanzata, il fumo di sigaretta, la presenza di malattie croniche, l'immunodeficienza. Il rischio di acquisizione della malattia è principalmente correlato alla suscettibilità individuale del soggetto esposto e al grado d'intensità dell'esposizione, rappresentato dalla quantità di *Legionella* presente e dal tempo di esposizione. Sono importanti inoltre la virulenza e la carica infettante dei singoli ceppi di *Legionella*, che, interagendo con la suscettibilità dell'ospite, determinano l'espressione clinica dell'infezione. Malgrado il carattere ubiquitario di *Legionella*, la malattia umana rimane rara; i tassi d'attacco nel corso di focolai epidemici sono bassi, inferiori al 5% (Edelstein, 1993).

La tabella 1 riassume e completa quanto sopra riportato.

Tabella 1. Fattori di rischio per infezione da *Legionella* per categoria di esposizione (*Legionella* and the prevention of legionellosis WHO, 2007).

	Legionellosi comunitaria	**Legionellosi associata ai viaggi**	**Legionellosi nosocomiale**
Modalità di trasmissione	Inalazione di aerosol contaminato (sospensione di particelle solide o liquide in aria)	Inalazione di aerosol contaminato	Inalazione di aerosol contaminato Aspirazione Infezione di ferite
Sorgente di infezione	Torri di raffreddamento Impianti idrici Vasche idromassaggio Stazioni termali Terriccio e composti per giardinaggio Impianti idrici di riuniti odontoiatrici	Torri di raffreddamento Impianti idrici Vasche idromassaggio Stabilimenti termali Umidificatori	Torri di raffreddamento Impianti idrici Piscine riabilitative Dispositivi per la respirazione assistita Vasche per il parto in acqua Altri trattamenti medici
Luogo e occasione di infezione	Siti industriali Centri commerciali Ristoranti Centri sportivi e centri benessere Residenze private	Alberghi Navi Campeggi Ristoranti Club Centri sportivi e centri benessere	Ospedali Utilizzo di dispositivi medici
Fattori di rischio (ambientali)	Vicinanza a sorgenti di trasmissione quali: torri di raffreddamento/condensatori evaporativi non mantenuti adeguatamente. Impianti idrici complessi e presenza di rami morti.	Soggiorno in alberghi o in camere con occupazione discontinua; erogazione intermittente dell'acqua, difficile controllo della temperatura; impianti idrici complessi; personale non formato per la prevenzione della legionellosi	Vapori in uscita da torri evaporative Impianti idrici complessi vetusti, con rami morti Impossibilità di garantire le temperature raccomandate Bassa pressione o flusso intermittente dell'acqua
Fattori di rischio (personali)	Età > 40 anni Sesso maschile Tabagismo Viaggi recenti Malattie concomitanti (diabete, malattie cardiovascolari, immunosoppressione da corticosteroidi, malattie croniche debilitanti, insufficienza renale cronica, malattie ematologiche, tumori, ipersideremia).	Età > 40 anni Sesso maschile Tabagismo Abuso di alcool Cambiamenti dello stile di vita Malattie concomitanti (diabete, malattie cardiovascolari e immunodepressione)	Immunosoppressione dovuta a trapianti o ad altre cause Interventi chirurgici a testa e collo, tumori, leucemie e linfomi, diabete, malattie croniche dell'apparato cardiaco e polmonare Utilizzo di dispositivi per la respirazione assistita Tabagismo e alcolismo

1.3. Frequenza della malattia

Sebbene la sorveglianza epidemiologica della legionellosi sia notevolmente migliorata negli ultimi anni, grazie alla maggiore sensibilizzazione dei medici e alla disponibilità di un test diagnostico semplice e non invasivo (antigene solubile nelle urine), questa malattia resta sotto-diagnosticata e anche sotto-notificata. Ecco perché nella maggior parte dei paesi è difficile determinare con precisione il tasso di morbosità e di mortalità. Nel 2012 in Europa sono stati riportati 5852 casi di legionellosi recensiti in 29 paesi europei. L'incidenza globale annuale della malattia in Europa nel 2012 si situa a 11,5 casi per 1.000.000 di abitanti, con un tasso di letalità del 9% (Fonte: ECDC, www.ecdc.europa.eu).

Nel 2013, secondo le notifiche pervenute all'ISS, l'incidenza della legionellosi in Italia è stata di 22,6 casi per 1.000.000 di abitanti con un tasso di letalità del 10,4%. Per informazioni più dettagliate, il lettore può consultare il sito dell'ISS http://www.iss.it/binary/publ dove sono pubblicati i dati epidemiologici a partire dal 1997. La Febbre di Pontiac e le altre infezioni extra-polmonari da *Legionella* non sono incluse nelle statistiche nazionali, nelle quali vengono conteggiate solo le polmoniti da *Legionella* confermate e probabili. In Tabella 2 è riportato il numero di casi di legionellosi notificato per regione, in Italia, negli ultimi cinque anni (Rota et al., 2012).

Tabella 2. Casi di legionellosi notificati per regione in ordine geografico da Nord a Sud e per anno nel quinquennio 2009-2013

Regione	2009	2010	2011	2012	2013
Piemonte	78	69	75	55	77
Valle D'Aosta	3	3	3	5	2
Lombardia	451	455	363	420	428
P.A. Bolzano	20	9	11	22	23
P.A.Trento	40	51	48	47	31
Veneto	82	96	60	130	82
Friuli V. G.	16	22	19	25	23
Liguria	29	36	22	17	46
Emilia R.	102	122	95	147	142
Toscana	132	97	94	116	127
Umbria	15	19	22	34	26
Marche	23	26	19	37	25
Lazio	117	104	63	151	153
Abruzzo	5	9	13	21	24
Molise	1	0	1	1	0
Campania	51	81	46	72	74
Puglia	20	14	16	24	26
Basilicata	0	7	5	7	16
Calabria	7	3	6	6	3
Sicilia	10	6	20	10	15
Sardegna	5	5	7	3	4
Totale	**1207**	**1234**	**1008**	**1350**	**1347**

1.4. Sintomatologia

La legionellosi può manifestarsi con due distinti quadri clinici: la Febbre di Pontiac e la Malattia dei Legionari.

La Febbre di Pontiac, dopo un periodo di incubazione di 24-48 ore, si manifesta in forma acuta simil-influenzale senza interessamento polmonare, e si risolve in 2-5 giorni. I prodromi sono: malessere generale, mialgie e cefalea, seguiti rapidamente da febbre, a volte con tosse e gola arrossata. Possono essere presenti diarrea, nausea e lievi sintomi neurologici quali vertigini o fotofobia.

La prima epidemia di Febbre di Pontiac è stata causata da *L. pneumophila* di sierogruppo 1 mentre epidemie successive sono state attribuite a *L. feeleii*, *L. anisa* e *L. micdadei*.

La Malattia dei Legionari, dopo un periodo di incubazione variabile da 2 a 10 giorni (in media 5-6 giorni), si manifesta come una polmonite infettiva, con o senza manifestazioni extrapolmonari. La sindrome pneumonitica non ha caratteri di specificità né clinici né radiologici. Nei casi classificabili come gravi secondo il punteggio "pneumonia severity index" (Fine et al., 1997) può insorgere bruscamente con febbre, dolore toracico, dispnea, cianosi, tosse produttiva associati alla obiettività fisica semeiologica del consolidamento polmonare. Nei casi classificabili come di gravità lieve (ma che poi se non adeguatamente trattati possono evolvere in polmonite grave) l'esordio può essere insidioso con febbre, malessere, osteoartralgie, tosse lieve, non produttiva. I quadri radiologici non sono patognomonici potendosi riscontrare addensamenti di tipo alveolare focali, singoli o multipli, monolaterali o disseminati con o senza evoluzione escavativa, come quadri inizialmente a impegno interstiziale.

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

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

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

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

1.5. Diagnosi di laboratorio: ricerca di *Legionella* in campioni di provenienza umana

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

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

- in pazienti con malattia severa che richieda il ricovero in un reparto di terapia intensiva;
- in pazienti che riferiscano fattori di rischio (Tabella 1);
- in pazienti che siano stati esposti a *Legionella* durante un'epidemia;
- in pazienti in cui nessun altra eziologia è probabile.

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

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

- isolamento del batterio mediante coltura;
- rilevazione di anticorpi su sieri nella fase acuta e convalescente della malattia;
- rilevazione dell'antigene urinario;
- rilevazione del batterio nei tessuti o nei fluidi corporei mediante test di immunofluorescenza;
- rilevazione del DNA batterico mediante PCR (metodo non ancora validato). Si suggerisce vivamente l'esecuzione di questo test come rapida analisi nei casi di polmonite sopra elencati. I campioni che da questo test avranno esito positivo, saranno saggiati poi mediante coltura. Questa pratica, adottata già da alcuni paesi europei, e suggerita dall'ECDC, ha consentito di isolare un maggior numero di ceppi dai pazienti dando la possibilità di risalire alla fonte di infezione.

Tuttavia, poiché nessun metodo di diagnosi di legionellosi è sensibile e specifico al 100% (come indicato nei paragrafi successivi), è ormai opinione condivisa a livello internazionale, che maggiore è il numero di metodi diagnostici utilizzati, più corretta sarà la diagnosi di legionellosi.

Infatti, la negatività di uno o di tutti i test diagnostici utilizzati e validati non esclude che ci si possa trovare di fronte ad un caso di legionellosi.

In Tabella 3 sono indicati i vari metodi con le relative percentuali di sensibilità e specificità.

Tabella 3. Confronto di metodi per la diagnosi di laboratorio della legionellosi (*Legionella* and the prevention of legionellosis WHO, 2007).

Metodo	Sensibilità %	Specificità %	Commenti
Coltura			Gold standard
Escreato	5-70	100	
BAL o aspirato trans-tracheale	30-90	100	
Biopsia di tessuto polmonare	90-99	100	
Sangue	10-30	100	
Sierologia			Può richiedere da 3 a 9 settimane. In pazienti immunocompromessi la risposta anticorpale può essere assente.
Sieroconversione	70-90	95-99	
Singolo siero	Non nota	50-70	
Antigene urinario	75-99*	99-100	Solo per *Lp. 1*. Poche informazioni disponibili per altri sierogruppi o specie. Molto rapido (15 min-3 h); generalmente molto precoce, può rimanere positivo per settimane e/o mesi.
Immmunofluorescenza Diretta (DFA)			Molto rapido (2-4h); sensibilità limitata, richiede esperienza.
Escreato o BAL	25-75	95-99	

Biopsia di tessuto polmonare	80-90	99	Reagenti non validati per non *Lp species*.
PCR			
Secrezioni del tratto respiratorio	85-92	94-99	Rapido. Metodo non ancora validato per la diagnosi; rileva tutte le specie di *Legionella*.
Urine, siero	33-70	98	

*La sensibilità della rilevazione dellì'antigene urinario effettuata mediante test immunocromatografico può decrescere da questo valore fino ad arrivare al 32% in alcuni kit disponibili in commercio, pertanto questo tipo di test dovrebbe essere utilizzato in aggiunta ad altri metodi per la diagnosi di legionellosi.

Metodo colturale

L'isolamento mediante coltura è considerato il metodo diagnostico di elezione per la diagnosi di legionellosi. I campioni dovrebbero essere prelevati prima del trattamento antibiotico, sebbene *Legionella* sia stata isolata da secrezioni del tratto respiratorio e dal sangue anche dopo alcuni giorni di trattamento antibiotico.

I campioni del tratto respiratorio (BAL, tracheoaspirato, liquido pleurico) e il parenchima polmonare, dovrebbero essere tempestivamente coltivati (Allegato 2) (Stout et al., 2003). Inoltre, un'emocoltura negativa, seminata successivamente su terreno specifico per *Legionella*, può dar luogo all'isolamento del microrganismo.

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

L'isolamento del batterio richiede terreni di coltura specifici poiché *Legionella* non cresce sui terreni di uso comune (Allegato 2), ed ha tempi di crescita relativamente lunghi (4-10 giorni).

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

L'uso di colorazioni batteriologiche può essere solo parzialmente utile. Tuttavia, è necessario prendere in considerazione una diagnosi di legionellosi se si osservano batteri Gram-negativi nelle secrezioni delle basse vie respiratorie di un paziente immunocompromesso, con una coltura negativa dopo 24 ore sui terreni di uso corrente.

La coltura è particolarmente importante per la diagnosi in alcuni casi:

- pazienti in cui la polmonite è severa e causa insufficienza respiratoria;
- pazienti immunocompromessi;
- infezioni nosocomiali;
- casi in cui si sospetta che la causa sia *Legionella* appartenente a specie differenti da *L. pneumophila* sierogruppo 1.

Rilevazione dell'antigene urinario

La presenza dell'antigene solubile di *Legionella* nelle urine (antigenuria) si rileva nella maggior parte dei pazienti da uno a tre giorni dopo l'insorgenza dei sintomi, con un picco a 5-10 giorni; può persistere per alcune settimane o mesi, soprattutto in pazienti immunocompromessi, dove può persistere per quasi un anno (Kohler et al., 1984). Inoltre, essendo la sensibilità al test spesso associata alla gravità della malattia (Yzerman et al., 2002) per evitare una mancata diagnosi, nei casi di polmonite meno grave, si dovrebbe fare ricorso ad altri test diagnostici. La sua presenza, tuttavia, può essere a volte intermittente, ma si rileva anche in corso di terapia

antibiotica (Luck et al., 2002). Questo test è attualmente validato esclusivamente per *L. pneumophila* sierogruppo 1, anche se, in una certa percentuale di casi, è stata riscontrata positività a seguito di infezioni causate da altri sierogruppi di *Legionella* (Benson et al., 2000; Olsen et al., 2009).

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

La determinazione può essere effettuata attraverso due metodi: metodo immunoenzimatico (EIA) e metodo immunocromatografico (ICT). Il trattamento del campione prima dell'analisi è indicato nell'Allegato 2.

Il metodo immunoenzimatico

L'EIA ha una specificità dell'80–85%, simile a quella della coltura (Svarrer CW et al., 2012; Helbig J et al 2003; Hackman et al., 1996; Kazandjian et al., 1997), ma una sensibilità maggiore. La determinazione dell'antigene urinario mediante EIA è il metodo di scelta per la diagnosi di infezione da *L. pneumophila* sierogrouppo 1 (Svarrer CWet al., 2012;Cosentini et al., 2001; Formica et al., 2001;).

Il metodo immunocromatografico

E' un saggio molto rapido (15 min-1h) per la rilevazione dell'antigene di *L. pneumophila* sierogruppo 1 che non richiede particolari attrezzature di laboratorio.

L'interpretazione dei risultati si basa sulla presenza o meno di due bande colorate, una del campione e l'altra del controllo. Qualsiasi linea visibile dà un risultato positivo. Tuttavia, campioni con bassa concentrazione di antigene potrebbero dare una linea di campione debole che può essere considerata "positiva" con sicurezza se aumenta in intensità, dopo 45' dalla prima osservazione (questo controllo è possibile solo con il test oggetto della pubblicazione di Helbig et al., 2001). Se la banda debole non aumenta di intensità, soprattutto nei casi in cui le urine sono patologiche in partenza (infezioni urinarie, proteinuria, ecc.) il referto deve essere formulato come dubbio, in attesa di essere confermato da altri test (Helbig et al., 2001).

Confrontato con altri metodi diagnostici, il test dell'antigene urinario presenta evidenti vantaggi: i campioni sono ottenuti facilmente, è rilevabile nelle fasi precoci della malattia e il test è facile e rapido da effettuare, oltre che specifico. Inoltre può essere rilevato anche nella Febbre di Pontiac (Burnsed et al., 2007).

Uno svantaggio consiste nel fatto che, proprio per la sua persistenza, può risultare difficile distinguere tra infezione acuta, fase di convalescenza o infezione pregressa.

In casi sospetti, in presenza di segni clinici di polmonite, oltre al test dell'antigene urinario andrebbe effettuato un ulteriore test diagnostico (esame colturale, sierologico e PCR), anche se, come dimostrato da recenti studi (Svarrer et al., 2012), questa pratica dovrebbe essere sempre adottata a causa della non elevata sensibilità soprattutto del test immunocromatografico. Un altro limite del test è che rileva prevalentemente gli antigeni di *L. pneumophila* sierogruppo 1.

Inoltre, benché la sensibilità complessiva del test sia pari al 75-99% per infezioni dovute a tale microrganismo, è da rilevare che la sensibilità può variare in particolari sottopopolazioni: pazienti con legionellosi associata ai viaggi, legionellosi acquisita in comunità e nosocomiale. Infatti, in queste tre categorie la sensibilità è rispettivamente pari al 94%, 76-87% e 44-46% (Helbig et al., 2003). Queste differenze sono dovute al fatto che il test rileva principalmente alcuni ceppi di *L. pneumophila* che sono predominanti nei casi di legionellosi associata ai viaggi.

Falsi positivi sono stati descritti in pazienti con malattia da siero (Deforges et al., 1999) e in infezioni ascrivibili a *Nocardia asteroides* (Bailleul et al., 2004) ed in un episodio pseudoepidemico correlato ad alcuni lotti di un test immunocromatografico fallaci (Rota et al. 2014). Uno studio sistematico che ha saggiato il test con numerosi ceppi di *Legionella* ha

rilevato una totale assenza di reattività di antigeni di specie di *Legionella* non-*pneumophila* (Okada et al., 2002).

Per rendere più affidabile la diagnosi mediante rilevazione dell'antigene urinario è consigliabile bollire le urine (vedi paragrafo dedicato nell'Allegato 2). La concentrazione delle urine migliora la sensibilità del test anche se può interferire con la specificità (Svarrer CW et al 2012).

Metodi sierologici

Immunofluorescenza indiretta (IFI)

I metodi sierologici sono utili per indagini epidemiologiche retrospettive ma sono meno validi per quelle cliniche, data la comparsa talvolta tardiva degli anticorpi specifici a livelli significativi e a causa della necessità di controllare un ulteriore campione di siero in fase di convalescenza.

Un aumento significativo del titolo anticorpale si presenta da 1 a 9 settimane dopo l'insorgenza della malattia in circa i tre quarti dei pazienti con coltura positiva per *L. pneumophila* sierogrouppo 1. In media i pazienti sviluppano anticorpi in due settimane, tuttavia oltre il 25% delle sieroconversioni non viene rilevato perché i sieri non vengono correttamente prelevati nella fase precoce e convalescente della malattia. Inoltre la determinazione della classe anticorpale non è d'aiuto nel differenziare tra un'infezione in atto e un'infezione pregressa. In alcuni studi le IgM si riscontano precocemente, altri studi hanno dimostrato che in questa fase ci sono sia IgM che IgG. In alcuni pazienti inoltre sono state riscontrate solo le IgG o solo le IgM, oppure possono persistere a lungo le IgM. Le IgA possono essere presenti in infezioni recenti ma vanno incontro a degradazione. Per questo motivo è opportuno utilizzare un test che metta in evidenza tutte le classi anticorpali.

Un aumento di quattro volte o più del titolo anticorpale tra due sieri prelevati nella fase acuta e convalescente della malattia ha valore diagnostico.

Un risultato positivo su un singolo siero ($\geq$256) ha un valore diagnostico presuntivo.

La definizione di questi criteri aiuta ad evitare falsi positivi dovuti a reazioni crociate con altri patogeni. In generale, il metodo sierologico ha un valore predittivo positivo (proporzione di realmente malati tra i positivi al test) piuttosto basso. Inoltre si possono avere falsi negativi a causa della scarsa risposta anticorpale di pazienti con polmonite da *Legionella* che generalmente hanno difese immunitarie compromesse oppure a causa della sieroconversione a volte molto tardiva, oppure semplicemente a causa dell'età avanzata in cui si verifica un naturale declino della risposta immunitaria. La sieroconversione può anche non essere osservata se nel test si utilizza un antigene non omologo (esistono ad esempio diversi sottotipi di *L. pneumophila*) che non reagisce con gli anticorpi sviluppati dal contatto con un altro sottotipo che può aver causato l'infezione.

Si deve infine rilevare che la specificità e la sensibilità dell'immunofluorescenza indiretta è stata valutata solo per *L. pneumophila* sierogruppo 1; la sensibilità e la specificità per altri sierogruppi o specie non sono note (Luck et al., 2002; Muder, 2000).

A causa della formazione di anticorpi cross-reattivi, circa il 50% dei pazienti infettati con *L. pneumophila* non-sierogrouppo 1 manifesta una sieroconversione con antigeni specifici di *L. pneumophila* sierogrouppo 1 (Edelstein, 2002). Un risultato negativo non esclude la diagnosi di legionellosi. Inoltre le preparazioni antigeniche differiscono nei diversi laboratori e tra le ditte produttrici di kit, e ciò produce diversi livelli anticorpali critici, pertanto per alcune preparazioni antigeniche la specificità potrebbe essere relativamente alta per un certo campione e bassa per un altro (Rose et al, 2002). L'esistenza di reattività crociata tra *Legionelle* e altri microrganismi

come ad esempio *Campylobacter* e *Pseudomonas* species (Boswell, 1996; Marshall et al., 1994), e la difficoltà di distinguere tra infezione in atto o infezione pregressa in caso di campione singolo di siero o di titolo anticorpale costante, rende la conferma diagnostica più complessa .

Microagglutinazione ed ELISA

Sono test sierologici più specifici per *L. pneumophila* sierogruppo 1 (Edelstein, 2002).

La microagglutinazione è un metodo rapido ed economico che permette di evidenziare anticorpi appartenenti essenzialmente, alla classe IgM, per questo motivo, e per tutto quanto detto in merito alla risposta anticorpale è una tecnica scarsamente utilizzata nella diagnosi di legionellosi.

Il metodo ELISA viene utilizzato sempre più frequentemente nei laboratori di diagnostica, grazie alla diffusione di numerosi kit commerciali; la concordanza tra il test ELISA e l'immunofluorescenza è del 91% circa (Edelstein, 2002). La sensibilità è tra l'80% e il 90% e la specificità è di circa il 98%.

Immunofluorescenza diretta (DFA)

L'evidenziazione di *Legionella* nei campioni clinici per mezzo dell'immunofluorescenza diretta, pur permettendo di confermare la diagnosi di polmonite da *Legionella* entro poche ore, ha una validità inferiore al metodo colturale. La tecnica si esegue in 2-3 ore circa, richiede una certa preparazione ed esperienza nella lettura del preparato ed è influenzata dalla specificità degli antisieri utilizzati e dalle dimensioni del preparato esaminato (Allegato 2). La DFA effettuata su escreato può dare risultati positivi fino a 2–4 giorni dopo l'inizio della terapia antibiotica e spesso anche per periodi più lunghi in casi di polmonite cavitaria (Luck et al., 2002).

La DFA è un metodo efficace con campioni di espettorato, aspirati endotracheali e trans-tracheali e su biopsie polmonari (Stout et al., 2003). Pazienti con legionellosi diagnosticata mediante coltura hanno una DFA positiva tra il 25% e il 70%, tuttavia la specificità del test è superiore al 99,9%. Pertanto un risultato negativo non esclude la diagnosi di legionellosi, ma un risultato positivo ha quasi sempre un valore diagnostico se la lettura del vetrino è stata fatta in modo corretto. Molta attenzione deve essere posta per prevenire i falsi positivi in DFA, quando i campioni sono stati a contatto con acqua o tamponi contaminati.

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

Amplificazione di geni specifici mediante PCR

La diagnosi di legionellosi in campioni clinici mediante *Polymerase Chain Reaction* (reazione a catena della polimerasi o PCR) si basa sulla determinazione della presenza di DNA genomico di *Legionella*, attraverso amplificazione di geni specifici (Cloud et al., 2000; Murdoch, 2003). L'introduzione della Real-Time PCR ha invece, rispetto alla PCR classica, il vantaggio di visualizzare la reazione in tempo reale, dando eventualmente anche informazioni sulla quantità di DNA presente nel campione. Per questo è molto spesso denominata anche PCR quantitativa (q-PCR). La Real-Time PCR è stata applicata per la singola determinazione di infezione da *L. pneumophila* e/o *Legionella species* (Templeton et al., 2003). Più recentemente

inoltre sono stati pubblicati numerosi articoli in cui sono descritti protocolli di "multiplex real-time PCR" per la diagnosi di polmoniti causate da *Legionella*, in cui si evidenziano contemporaneamente *Legionella pneumophila* sierogruppo 1, tutti i sierogruppi di *Legionella pneumophila* e le altre specie di *Legionella* (Benitez AJ, Winchell JM, 2013). Attraverso la multiplex real-time PCR sono stati sviluppati anche dei saggi attraverso i quali è possibile mettere in evidenzia simultaneamente il DNA di *Legionella* e di alcuni dei microorganismi più frequentemente associati con le infezioni polmonari quali *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Streptococcus* (Nomanpour et al 2012; Al-Marzooq et al 2011, McDonough et al., 2005).

Gli articoli pubblicati illustrano come la diagnosi mediante amplificazione di geni specifici sia vantaggiosa rispetto all'esame colturale perché richiede tempi di analisi di poche ore, ed ha una sensibilità pari, se non superiore, all'esame colturale, pur utilizzando quantità minime di DNA genomico. La sensibilità della PCR dipende dal tipo di campione: è più elevata (> 99%) per analisi effettuate su campioni del tratto respiratorio (espettorato, broncoaspirato, broncolavaggio) e si riduce per campioni rappresentati da altri liquidi corporei (sieri o urine) (Murdoch 2003; Aoki et al., 2003; Diederen et al., 2007). La specificità è data dal gene e/o dalla porzione di gene target scelto per l'amplificazione. I geni target più frequentemente analizzati sono: *mip*, 16S rDNA, *5S rDNA*.

I saggi di Real-Time PCR per la rilevazione di *Legionella* su campioni clinici hanno il vantaggio rispetto alla PCR qualitativa di ridurre il rischio di contaminazione del campione, minimizzare il tempo di analisi ed essere ancora più specifici. Inoltre, rispetto ai metodi classici di identificazione, la Real-Time PCR permette il riconoscimento delle numerose specie ad oggi identificate e di tutti i sierogruppi della specie *pneumophila*.

1.6 Ricerca di Legionella in campioni di provenienza ambientale

Metodo colturale

A livello internazionale sono state redatte due norme che descrivono la determinazione di *Legionella* in matrici ambientali: ISO 11731-1:1998 "Water quality- detection and enumeration of *Legionella*" e ISO N. 11731-2: 2004 "Water quality- detection and enumeration of *Legionella*" Part 2: "Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts". Le matrici ambientali che vengono generalmente utilizzate per la ricerca di *Legionella* in campioni ambientali sono: acqua, sedimenti, biofilm.

Il metodo analitico è riportato nell'Allegato 4.

Real-Time PCR

La prima norma relativa all'uso di questa metodologia è stata elaborata dall'Association Française de Normalisation (AFNOR) che ha sviluppato uno standard (Détection et quantificationdes Legionella et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne **(PCR)** NF T90-471, 2010) per assicurare l'equivalenza dei risultati ottenuti da differenti q-PCR (Anon., 2010) e alcuni kit commerciali sono stati messi a punto sulla base di tale norma.

Recentemente è stata pubblicata la norma ISO *"Water quality- Detection and quantification of Legionella spp and/or Legionella pneumophila by concentration and genic amplification by*

quantitative polymerase chain reaction (qPCR)" (ISO/TS 12869, 2012) che aggiorna e specifica i requisiti metodologici, di valutazione e controllo di qualità del metodo qPCR applicato a *Legionella*. Tale normativa detta le linee-guida per l'elaborazione di un metodo affidabile e riproducibile tra differenti laboratori. Tuttavia, a meno di non disporre di un sistema per l'analisi di DNA di *Legionella* mediante PCR per il quale siano stati verificati tutti i criteri di un metodo standard, la qPCR resta non validato. Inoltre, poiché, così come specificato nella stessa norma, la qPCR non da informazione riguardo lo stato delle cellule, la quantificazione dovrà sempre essere determinata mediante esame colturale.
Alcuni studi condotti al fine di confrontare il metodo colturale con la Real-Time PCR mostrano un più elevato numero di campioni positivi e valori più alti di quantificazione rilevati con la Real-Time PCR rispetto alla coltura (Behets et al., 2007; Buchbinder et al., 2002; Joly et al., 2006a; Levi et al., 2003; Yamamoto et al., 1993; Yaradou et al., 2007). Diverse ragioni sono state indicate per spiegare queste differenze tra cui le più importanti sono la rilevazione di DNA di batteri morti o danneggiati o di cellule vitali ma non coltivabili, oppure di DNA di *Legionella* intra-amoeba (Alleron et al., 2008; Shih and Lin, 2006). Ciò che maggiormente limita l'uso della qPCR rispetto alla coltura è che nella legislazione nazionale, così come in quella europea e dell'OMS, i livelli di azione sono espressi in unità formanti colonia per litro e non in unità genomiche per litro e non esiste a tutt'oggi un consenso di come i risultati ottenuti da un metodo possano essere raffrontati con quelli ottenuti dall'altro. In uno studio multicentrico internazionale, recentemente pubblicato, è stato analizzato un numero elevato di campioni ambientali e i risultati ottenuti da analisi mediante qPCR e mediante coltura sono stati confrontati (Lee et al., 2011). L'elaborazione dei dati raccolti ha consentito la determinazione di livelli di allerta e/o di azione espressi come unità genomiche per litro che comunque sono strettamente legati al tipo di protocollo di qPCR utilizzato come confronto con il metodo colturale.

Poiché la q-PCR è effettivamente vantaggiosa per molteplici aspetti ma non ancora validata a livello internazionale, essa può, ad oggi, essere solo consigliata per una rapida analisi di numerosi campioni prelevati da siti probabilmente associati ad un caso o ancor più a un cluster di legionellosi, potendo in tempi brevi escludere i siti negativi ed identificare quelli positivi. I campioni risultati positivi devono essere comunque analizzati con il metodo colturale.

1.7 Terapia

I batteri appartenenti al genere *Legionella* sono microrganismi essenzialmente intracellulari. Di conseguenza, tutti gli agenti antimicrobici efficaci nel trattamento delle legionellosi devono essere in grado di concentrarsi ed essere attivi a livello intracellulare (Horwitz, 1983). Inoltre, questi stessi farmaci devono essere in grado di distribuirsi e persistere adeguatamente nei tessuti infetti da *Legionella*. La Febbre di Pontiac ha una evoluzione benigna anche in assenza di specifico trattamento chemioterapico. Tutte le altre malattie sostenute da *Legionella* species, dalle più comuni polmoniti, alle meno frequenti infezioni extrapolmonari, viceversa, richiedono un trattamento specifico per ridurre la probabilità di un esito infausto.

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

Sulla base di numerosi studi condotti *in vitro* misurando l'attività anti-*Legionella* (nella maggior parte dei casi *L. pneumophila* sierogruppo 1) in macrofagi alveolari polmonari di cavie

e, meno frequentemente, in monociti umani o altre linee cellulari, i chinoloni (in particolare la levofloxacina) sono risultati superiori ai macrolidi Tra questi ultimi, azitromicina è apparsa superiore a claritromicina, ed entrambi questi due farmaci si sono dimostrati superiori alla eritromicina (Edelstein and Cianciotto, 2005; Pedro-Botet and Yu, 2006). Sul piano clinico non esistono studi prospettici randomizzati di paragone tra un macrolide ed un chinolone o fra antibiotici appartenenti alla stessa classe di farmaci nel trattamento della polmonite da *Legionella*. Infatti, gli unici dati disponibili in letteratura fanno riferimento a studi osservazionali. Tra questi quelli più validi in termini di numero di casi osservati sono tre, tutti pubblicati nel 2005 (Blazquez Garrido et al., 2005; Mykietiuk et al., 2005; Sabria et al., 2005): due sono retrospettivi ed uno prospettico. Visti nel loro complesso i dati cumulativi dei tre studi riguardarono 658 pazienti, di cui 221 trattati con un macrolide e 237 con un chinolone. I pazienti trattati con il chinolone ebbero una più rapida defervescenza (mediamente in 66 ore, contro 97 ore con il macrolide), una minore durata della degenza ospedaliera (mediamente 6,6 giorni, contro 9,0 con il macrolide) una minore incidenza di complicanze, quali ascesso-cavitazione polmonare, empiema pleurico, shock settico, necessità di supporto respiratorio con ventilazione meccanica (8,4% contro 18,5% con il macrolide) e una più bassa mortalità (2,1% contro 4,5% con il macrolide). Anche gli effetti collaterali indesiderati furono 12,5% con il chinolone contro 23,4% con il macrolide.

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

A far spostare l'ago della bilancia leggermente a favore della levofloxacina sono una serie di considerazioni. Innanzitutto esiste una vasta esperienza con questo farmaco, che è superiore rispetto a tutti gli altri farmaci anti-*Legionella*. Un dato estremamente impressionante fu lo 0% in termini di mortalità che fu registrato nei sei studi clinici condotti per la approvazione del farmaco da parte della Food and Drug Administration (Yu et al., 2004). Infine, il più ampio spettro antimicrobico (esteso ai ceppi penicillina-macrolide resistenti di *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* meticillina sensibile, *Pseudomonas aeruginosa* e le enterobacteriaceae, che possono co-infettare pazienti resi immunodeficienti dalla stessa malattia da *Legionella*) di levofloxacina rispetto a tutti gli altri antibiotici anti-*Legionella* (Edelstein and Cianciotto, 2005). Azitromicina, come mostra la Tabella 4b, rappresenta comunque una prima scelta nella terapia della legionellosi.

Sulla base di tutte le osservazioni e considerazioni menzionate nel presente paragrafo, e sintetizzando le opinioni riportate da esperti in trattati di riferimento (Edelstein and Cianciotto, 2005; Gilbert et al., 2008), è stata elaborata la Tabella 4 ove le varie opzioni terapeutiche sono indicate in prima, seconda o terza scelta per il trattamento di polmoniti da *Legionella* con diverso grado di gravità e/o in pazienti con diverso grado di immunocompetenza.

La durata delle varie terapie antibiotiche indicate in Tabella 4a e 4b si riferisce alle infezioni polmonari non complicate: ascessi polmonari, empiemi pleurici, endocarditi o altre infezioni extrapolmonari possono richiedere trattamenti assai prolungati, secondo il giudizio del clinico infettivologo. Deve essere sottolineato che le polmoniti da *Legionella* comportano alterazioni radiologiche che regrediscono assai lentamente, a volte solo dopo cinque-sei mesi, così come

un'antigenuria che può persistere positiva per mesi (Edelstein and Cianciotto, 2005). Per questo motivo tali esami non vanno considerati per modificare la durata "standard" delle varie terapie antibiotiche.

Tabella 4a: Trattamenti raccomandati per polmonite di grado lieve* in paziente non immunocompromesso

Antibiotico	Dosi e durata ** di trattamento
Prima scelta:	
levofloxacina	500 mg per os ogni 24 ore per 7-10 gg.
moxifloxacina	400 mg per os ogni 24 ore per 7-10 gg.
ciprofloxacina	500 mg per os ogni 12 ore per 7-10 gg.
azitromicina	500 mg per os ogni 24 ore per 3-5 gg.
claritromicina	500 mg per os ogni 12 ore per 10-14 gg.
Seconda scelta:	
eritromicina	500 mg per os ogni 6 ore per 10-14 gg.
doxiciclina	200 mg per os prima dose, poi
	100 mg ogni 12 ore per 10-14 gg.

*definizione di polmonite di "grado lieve":
1. "pneumonia severity index" score: classi I-III
2. "CURB-65" score: classe I
**La durata delle varie terapie antibiotiche raccomandate si riferisce alle infezioni polmonari: questa può essere significativamente più lunga nei pazienti con ascesso polmonare, empiema, endocardite o altre infezioni a sede extrapolmonare.
Levofloxacina, ciprofloxacina, claritromicina, eritromicina, rifampicina richiedono aggiustamenti posologici in caso di insufficienza renale.
Moxifloxacina, azitromicina, doxiciclina non richiedono aggiustamenti posologici in caso di insufficienza renale.

Tabella 4b: Trattamenti raccomandati per polmonite di grado grave* o in paziente immunocompromesso

Antibiotico	Dosi e durata** di trattamento
Prima scelta:	
levofloxacina	500-750 mg ev ogni 24 h. per 10-14 gg ***
azitromicina	500 mg ev ogni 24 h. per 7-10 gg ***
Seconda scelta:	
ciprofloxacina	400 mg ev ogni 8 ore per 14 gg o 750 per os BID ***
moxifloxacina	400 mg ev ogni 24 ore per 14 gg ***
Terza scelta:	
eritromicina	0.75-1gr ev ogni 6 ore per 3-7 gg., poi 500 mg ogni 6 ore per 21 gg,
in combinazione con rifampicina	300-600 mg per os o ev ogni 12 ore per 5 gg

*definizione di polmonite di "grado grave":
1."pneumonia severity index" score: classi IV e V.
2."CURB-65" score: classi II e III
**La durata delle varie terapie antibiotiche raccomandate si riferisce alle infezioni polmonari: questa può essere significativamente più lunga nei pazienti con ascesso polmonare, empiema, endocardite o altre infezioni a sede extrapolmonare.
Levofloxacina, ciprofloxacina, claritromicina, eritromicina, rifampicina richiedono aggiustamenti posologici in caso di insufficienza renale.
Moxifloxacina, azitromicina, doxiciclina non richiedono aggiustamenti posologici in caso di insufficienza renale.
*** il passaggio dalla somministrazione endovenosa a quella orale può essere considerato nei pazienti clinicamente stabili, che migliorano prontamente dopo l'inizio della terapia endovenosa.

2. SORVEGLIANZA E INDAGINE EPIDEMIOLOGICA

2.1 La sorveglianza epidemiologica

Obiettivi

I principali obiettivi della sorveglianza epidemiologica della legionellosi sono:

- monitorare la frequenza di legionellosi sia dal punto epidemiologico che clinico, con particolare attenzione ai fattori di rischio per l'acquisizione della malattia;
- identificare eventuali variazioni nell'andamento della malattia;
- identificare cluster epidemici di legionellosi dovuti a particolari condizioni ambientali al fine di evidenziare i fattori di rischio ed interrompere la catena di trasmissione.

Definizione di caso

La definizione di caso sotto riportata è stata aggiornata in accordo con la Decisione della Commissione Europea dell'8 agosto 2012 recante modifica della Decisione 2002/253/CE che stabilisce la definizione dei casi ai fini della dichiarazione delle malattie trasmissibili alla rete di sorveglianza comunitaria istituita ai sensi della Decisione n. 2119/98/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio.

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

Caso accertato

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

1. isolamento di *Legionella* da materiale organico (secrezioni respiratorie, broncolavaggio, tessuto polmonare, essudato pleurico, essudato pericardico, sangue) o da un sito normalmente sterile;
2. riconoscimento dell'antigene specifico solubile nelle urine;
3. aumento di almeno 4 volte del titolo anticorpale specifico verso *L. pneumophila* sg 1, rilevato sierologicamente tra due sieri prelevati a distanza di almeno 10 giorni.

Caso probabile

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

1. rilevazione di *Legionella pneumophila nelle* secrezioni respiratorie o nel tessuto polmonare mediante immunofluorescenza diretta utilizzando reagenti a base di anticorpi monoclonali;

2. identificazione dell'acido nucleico di *Legionella* in un campione clinico;
3. aumento di almeno 4 volte del titolo anticorpale specifico, relativo a sierogruppi o specie diverse da *L. pneumophila* sg1;
4. singolo titolo anticorpale elevato (≥1:256) verso *L. pneumophila* sg1.

In Tabella 5 sono riportate le varie definizioni di caso e di cluster in relazione all'esposizione, secondo l'OMS.

Tabella 5. Definizioni di caso in relazione all'esposizione. (*Legionella* and the prevention of legionellosis WHO, 2007)

Legionellosi	**Definizioni di caso secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità**
Caso associato all'assistenza sanitaria	**Accertato**: caso confermato mediante indagini di laboratorio verificatosi in un paziente ospedalizzato continuativamente per almeno 10 giorni prima dell'inizio dei sintomi. **Probabile:** caso dilegionellosi in un .paziente ricoverato per 1-9 giorni nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi (con data di inizio dei sintomi tra il terzo e il nono giorno) in una struttura sanitaria associata: -con uno o più precedenti casi di legionellosi oppure -in cui venga isolato un ceppo clinico identico (mediante tipizzazione molecolare) al ceppo ambientale isolato nello stesso periodo nell'impianto idrico della struttura sanitaria. **Possibile:** caso di legionellosi in una persona ricoverata per un periodo variabile da 1 a 9 giorni nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi in una struttura sanitaria non precedentemente associata con casi di legionellosi e in cui non è stata stabilita un'associazione microbiologica tra l'infezione e la struttura stessa.
Caso associato a viaggi	Caso associato con soggiorno fuori casa di durata variabile da una a più notti, nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi, nel proprio paese di residenza o all'estero.
Cluster associato a viaggi/nosocomiale	Due o più casi che hanno soggiornato nella stessa struttura recettiva o sanitaria nell'arco di due anni.
Cluster comunitario	Aumento del numero di casi di malattia in una cerchia relativamente ristretta di popolazione e in un arco di tempo limitato (due o più casi correlati, ad es. per area di lavoro, di residenza o per luogo visitato, fino ad un massimo di 10 casi)
Focolaio epidemico (o epidemia) comunitario	Aumento del numero di casi di malattia (>10) in una cerchia relativamente ristretta di popolazione e in un arco di tempo limitato con forte sospetto epidemiologico di comune sorgente di infezione con o senza evidenza microbiologica.

Il sistema di notifica

La notifica dei casi di legionellosi è obbligatoria, secondo le indicazioni del D.M. 15/12/90 e successive integrazioni. Tale decreto è in corso di aggiornamento, ai fini del recepimento delle decisioni n. 2119/98/CE, n. 2002/253/CE e n. 2012/506/UE del Parlamento e del Consiglio europeo, riguardanti la rete di sorveglianza comunitaria, la definizione dei casi ai fini della dichiarazione delle malattie trasmissibili e le reti di sorveglianza dedicate per le malattie trasmissibili.

L'invio della notifica secondo il DM 15/12/90 non sostituisce l'invio della scheda di sorveglianza (Allegato 7), secondo quanto previsto dalla Circolare 400.2/9/5708 del 29/12/93 e sue successive modifiche.

I dati riguardanti i casi notificati di legionellosi sono pubblicati annualmente sul Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità, stratificati per regione, provincia, età e sessohttp://www.iss.it/index.php?id=30&lang=1&tipo=45. Inoltre è possibile consultare una sintesi della sorveglianza epidemiologica relativa al periodo 2000-2011 nella pubblicazione di Rota et al. 2013.

Il sistema di sorveglianza speciale: il registro nazionale della legionellosi

Il medico che pone la diagnosi deve compilare la scheda di sorveglianza (Circolare 400.2/9/5708 del 29/12/93 e successive integrazioni) che deve essere inviata alla ASL di competenza, al Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute (CNESPS) e al Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate (DMIPI) dell'ISS entro 48 ore.

I ceppi clinici di *Legionella* eventualmente isolati dal materiale biologico del paziente devono essere inviati per la tipizzazione o la conferma al Laboratorio Nazionale di Riferimento per la legionellosi del DMIPI. L'invio dei ceppi isolati da matrici ambientali, deve avvenire in tutti i casi in cui si sono verificati dei cluster o nei casi in cui è possibile effettuare un confronto tra il ceppo clinico e quello ambientale correlato. I risultati della tipizzazione/conferma o del confronto tra ceppi clinici e ambientali vengono comunicati ai laboratori e alle ASL/regioni che li hanno inviati.

Poiché, la scheda di sorveglianza deve essere inviata all'ISS entro 48 ore dalla diagnosi, anche se incompleta, tutte le informazioni raccolte successivamente (ad es. data di dimissione, esito della malattia, esito delle indagini, ecc.), devono essere re-inviate all'ISS.

I dati contenuti nella scheda di sorveglianza speciale (anagrafici, statistico-epidemiologici, clinici) vengono elaborati periodicamente e annualmente viene redatto un rapporto informativo sui risultati della sorveglianza (Notiziario ISS, http://www.iss.it/publ/?lang=1)

La ricerca di *Legionella* è tecnicamente difficile, richiede laboratori specializzati e accreditati per la ricerca di *Legionella* e personale addestrato. Per questo motivo, ai fini di una efficace sorveglianza sul territorio nazionale è stata costituita una rete di Laboratori individuati dalle Regioni, in base ai requisiti necessari per svolgere attività di diagnosi e controllo per *Legionella spp.*, organizzati in livelli gerarchici, con ordine crescente di responsabilità di diagnostica, di attività e di strutture (Laboratorio di Base e Laboratorio Regionale di Riferimento), collegati al Laboratorio Nazionale di Riferimento, situato presso il Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità.

In caso di cluster i campioni ambientali devono sempre essere analizzati dai laboratori di riferimento regionali.

Nell'Allegato 8 è riportato l'elenco dei Laboratori di Riferimento Regionali sia per la diagnosi ambientale che per la diagnosi clinica di legionellosi.

La sorveglianza internazionale della legionellosi nei viaggiatori

Parallelamente al sistema di sorveglianza dei casi italiani, esiste dal 1986 un programma di sorveglianza internazionale della legionellosi nei viaggiatori che è stato coordinato fino al 1993 dal National Bacteriology Laboratory di Stoccolma e dal 1994 a marzo 2010 dall'Health Protection Agency di Londra.

Tale programma, al quale aderisce anche l'Italia, attualmente denominato ELDSNet e coordinato dall'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) di Stoccolma, si basa su una rete di collaboratori nominati dal Ministero della Salute dei vari Paesi. I collaboratori di ELDSNet, in genere due per ogni paese (un microbiologo e un epidemiologo) sono incaricati di raccogliere e trasmettere informazioni relative ai viaggi e alle indagini epidemiologiche ed ambientali effettuate per tutti i casi, sia italiani che stranieri, di legionellosi associata ai viaggi che si verificano nel loro paese.

I casi vengono generalmente notificati dai collaboratori del paese di residenza del turista al centro di coordinamento di Stoccolma (occasionalmente è possibile che la notifica venga fatta da un Paese diverso da quello di residenza del paziente) tramite una password protetta del sito ELDSNet. I casi devono essere notificati appena si hanno le informazioni epidemiologiche, microbiologiche e relative al viaggio.

Il caso viene inserito nel database internazionale e il centro di coordinamento verifica l'esistenza di altri casi collegati alla stessa struttura recettiva. Se non ce ne sono, il centro di coordinamento notifica immediatamente il caso singolo al collaboratore del paese in cui è stata contratta l'infezione, che deve attivare l'indagine epidemiologica ed ambientale.

La Figura 1 illustra i flussi informativi e le procedure d'intervento da attuare in presenza di casi di legionellosi associata ai viaggi.

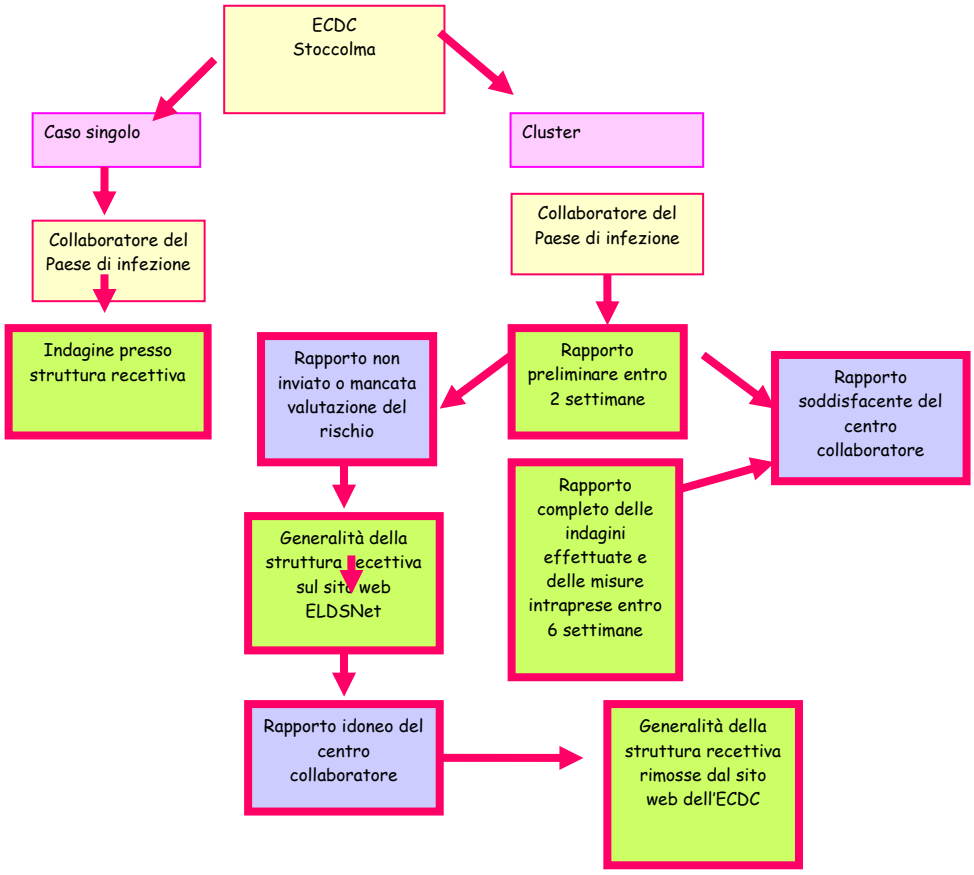


Figura 1. Diagramma di flusso per il follow-up di casi singoli e cluster

L'ELDSNet segnala all'Istituto Superiore di Sanità (CNESPS e DIPMIPI) i casi di legionellosi che si sono verificati in viaggiatori stranieri che hanno trascorso un periodo in Italia, riportando informazioni sulle strutture recettive in cui hanno soggiornato i pazienti e che potrebbero rappresentare le fonti dell'infezione. Il CNESPS provvede, a sua volta, a segnalare i casi alle competenti Autorità delle Regioni e delle ASL coinvolte, al fine di attivare l'indagine ambientale ed epidemiologica locale.

Il risultato finale delle indagini che i referenti regionali e di ASL inviano all'ISS viene poi trasmesso al gruppo di lavoro europeo.

Cluster di casi

L'identificazione di un cluster (due o più casi di legionellosi associati al soggiorno presso la medesima struttura recettiva nell'arco di due anni) richiede una risposta immediata da parte dell'ECDC e del collaboratore del paese nel quale è stata contratta l'infezione. Il cluster viene inserito nel database internazionale e tutti i collaboratori ELDSnet vengono immediatamente informati. Anche l'Organizzazione Mondiale della Sanità viene informata di tutti i cluster associati a strutture recettive, verificatisi sia nei Paesi appartenenti alla rete di sorveglianza che in quelli non appartenenti alla rete europea. Qualora il paese coinvolto non faccia parte dalla rete, l'OMS provvede ad informare il Ministero della Salute del paese interessato (European guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires' Disease, 2004).

Risposta del collaboratore nel paese in cui è stata contratta l'infezione

Il collaboratore deve informare l'autorità sanitaria locale competente affinché venga organizzata tempestivamente l'ispezione della struttura, la valutazione del rischio, l'indagine ambientale e l'attuazione di idonee misure di controllo.

Rapporto preliminare entro due settimane

Il collaboratore è tenuto a inviare entro due settimane dalla notifica di un cluster un rapporto preliminare all'ECDC (Modulo A, Allegato 9) in cui si specifica se è avvenuta o meno un'ispezione e una valutazione del rischio nella struttura. Il periodo di due settimane ha inizio una volta che i dettagli relativi alla struttura recettiva (ad es. nome e indirizzo) siano stati verificati come corretti dal collaboratore del paese in cui è stata contratta l'infezione. Il rapporto deve anche specificare se sono in corso misure di controllo e se la struttura rimane aperta o meno.

Qualora il rapporto preliminare non venga inviato entro i termini indicati, ovvero nel caso in cui tale rapporto indichi la mancata attuazione della valutazione del rischio o l'inadeguatezza delle misure di controllo intraprese, i collaboratori di tutti i Paesi verranno informati e il nome dell'albergo verrà reso noto sulla sezione del sito dell'ECDC (ELDSNet) accessibile al pubblico. Questa segnalazione rimarrà sul sito finché non verrà inviato un rapporto che comunichi la messa in atto di idonee misure di controllo.

Rapporto finale entro sei settimane dalla notifica del cluster

Dopo ulteriori quattro settimane (cioè dopo 6 settimane dalla notifica), è necessario inviare al centro di coordinamento un rapporto conclusivo (Modulo B, Allegato 10) che descrive le indagini e le misure di controllo intraprese, compresi i risultati del campionamento effettuato. Se questo rapporto non viene inviato o se riporta che le misure di controllo sono insoddisfacenti,

il nome della struttura recettiva viene pubblicato sul sito web dell'ECDC (http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/ELDSNet/Pages/Index.aspx). Il nome della struttura viene cancellato dal sito solo a fronte di un rapporto che dichiari che sono state intraprese misure di controllo adeguate.

2.2. Indagine epidemiologica

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

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

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

Tranne che in caso di legionellosi associata a esposizioni note (ad es.: cure termali, strutture recettive, ospedali, ecc.) in cui le strutture interessate devono immediatamente effettuare un'indagine ambientale con prelievo di campioni, l'indagine in presenza di un caso isolato, senza esposizioni ambientali a rischio, non necessita, in genere, di essere corredata da prelievi ambientali sistematici al domicilio del malato.

Considerata la molteplicità delle fonti potenziali e dell'ampia diffusione di *Legionella* nell'ambiente, la decisione di effettuare l'indagine presso l'abitazione del malato è lasciata al competente servizio territoriale che deve valutare di volta in volta l'opportunità di effettuare o meno dei campionamenti ambientali, sulla base della valutazione dei rischio.

L'approfondimento delle indagini dipende dal contesto e dal numero di casi (casi sporadici, focolai, cluster).

Per avere un quadro globale della situazione è fondamentale disporre, per ciascun paziente affetto da legionellosi, di informazioni precise su una eventuale esposizione a rischio nei 10 giorni precedenti l'insorgenza dei sintomi.

L'anamnesi deve approfondire almeno i punti seguenti:

- Professione, esposizione ad acqua nebulizzata sul luogo di lavoro.
- Luogo di soggiorno frequentato: abitazione, ospedale, casa di cura, casa di riposo, strutture turistico-recettive.
- Frequentazione di impianti termali, impianti natatori, centri sportivi, centri benessere, utilizzo di idromassaggi.
- Partecipazione a crociere, fiere, esposizioni.
- Terapia respiratoria, trattamenti odontoiatrici.
- Frequentazione di ambienti climatizzati e/o ad uso collettivo.

Casi isolati

I casi isolati di legionellosi necessitano di essere validati da un'anamnesi approfondita e eventualmente confermati da un secondo esame di laboratorio.

I passi da intraprendere, in presenza di un caso singolo, sono i seguenti:

- conferma della diagnosi;

- ricerca dell'esposizione mediante anamnesi mirata: frequentazione di luoghi a rischio nei 10 giorni precedenti l'insorgenza dei sintomi;
- notifica alle autorità sanitarie. Se si tratta di una legionellosi associata ai viaggi comunicare la data e il luogo esatto del soggiorno (città, struttura recettiva, numero di stanza) perché questo tipo d'infezione è sottoposto a notifica internazionale (ELDSNet);
- aumentata vigilanza verso la segnalazione ripetuta di situazioni simili;
- un caso confermato per il quale si sospetta un'infezione di origine nosocomiale, associata ai viaggi, professionale o termale, richiede indagini supplementari. Ricerca di altri casi, ispezione dei luoghi, ricerca di *Legionella* nell'acqua;
- in alcune situazioni particolari (ad esempio in pazienti immunodepressi) sono particolarmente raccomandati dei controlli sulla rete idrica domestica.

Cluster

In presenza di 2 o più casi di supposta origine comune, è necessario identificare la fonte di infezione. Se l'anamnesi non evidenzia alcuna esposizione a rischio comune, può essere impossibile trovare l'origine dell'infezione. Dopo un'analisi descrittiva, possono essere necessarie un'indagine ambientale e uno studio epidemiologico-analitico (coorte, caso-controllo).

I passi da intraprendere, in presenza di un cluster o di un focolaio epidemico, sono i seguenti:

- conferma di laboratorio della diagnosi. Si raccomanda, quando possibile, coltura delle secrezioni bronchiali o dell'espettorato e tipizzazione del germe in causa;
- notifica immediata alle autorità sanitarie e all'ISS (da completare in seguito con i risultati dell'indagine epidemiologica);
- ricerca di altri possibili casi nei co-esposti alla stessa fonte e conferma della diagnosi;
- descrizione della distribuzione nel tempo e nello spazio dei casi confermati, dei casi possibili e eventualmente dei casi dubbi. Rappresentazione grafica della curva epidemica;
- ricerca delle caratteristiche comuni: interviste sul luogo di soggiorno e attività svolte nei 10 giorni precedenti la malattia;
- formulazione di ipotesi riguardo all'origine dell'infezione;
- a seconda della dimensione del problema e delle ipotesi emerse dall'analisi descrittiva effettuare indagini ambientali e confronto dei ceppi di *Legionella* isolati dal malato con quelli ambientali; per la tipizzazione e il confronto inviare gli isolati a un laboratorio di riferimento (regionale o nazionale);
- ricerca della fonte d'infezione con uno studio epidemiologico-analitico.

In Allegato 11 è riportato un esempio di questionario da utilizzare per l'indagine epidemiologica di un focolaio di casi di legionellosi di origine comunitaria.

3. PROTOCOLLO DI CONTROLLO DEL RISCHIO LEGIONELLOSI

3.1. Introduzione

Il Protocollo di Controllo del Rischio legionellosi si divide in tre fasi sequenziali e correlate tra loro:

- ***Valutazione del rischio***: indagine che individua le specificità della struttura e degli impianti in essa esercitati, per le quali si possono realizzare condizioni che collegano la presenza effettiva o potenziale di *Legionella* negli impianti alla possibilità di contrarre l'infezione. Le informazioni relative alla Valutazione del rischio ed al relativo Piano di Controllo devono essere comunicate dall'incaricato della Valutazione al gestore della struttura o a un suo preposto che, a loro volta, dovranno informare tutte le persone che sono coinvolte nel controllo e nella prevenzione della legionellosi nella struttura.
- ***Gestione del rischio***: tutti gli interventi e le procedure volte a rimuovere definitivamente o a contenere costantemente le criticità individuate nella fase precedente. Qualsiasi intervento manutentivo o preventivo attuato deve essere il risultato di una strategia che preveda un gruppo di lavoro multidisciplinare, che consideri tutte le caratteristiche dell'impianto e le possibili interazioni nell'equilibrio del sistema.
- ***Comunicazione del rischio***: tutte le azioni finalizzate a informare, formare, sensibilizzare i soggetti interessati dal rischio potenziale (gestori degli impianti, personale addetto al controllo, esposti, ecc.).

A tale scopo l'informazione e la formazione sono un elemento essenziale per garantire la corretta applicazione delle indicazioni per la prevenzione ed il controllo della legionellosi. Tale aspetto è valido nei riguardi di qualunque struttura nella quale siano esercitati impianti a rischio legionellosi.

E' quindi auspicabile che i Dipartimenti di Prevenzione delle ASL organizzino attività formative/informative rivolte a:

- ✓ 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,

con l'obiettivo di favorire l'acquisizione delle conoscenze necessarie a controllare l'intero ciclo d'analisi e riduzione del rischio, adottando le migliori soluzioni impiantistico-gestionali atte a minimizzare il rischio nell'ambito delle rispettive strutture di competenza.

I Dipartimenti di Prevenzione delle ASL dovranno inoltre valutare l'opportunità di informare i medici e la popolazione generale sulle misure utili a ridurre il rischio, in particolare, presso le proprie abitazioni, soprattutto laddove vi siano pazienti immunocompressi.

È necessario che il Protocollo venga applicato in ogni struttura (sia civile sia industriale) nel quale siano presenti impianti potenzialmente a rischio legionellosi.

A seguire, sono riportati i riferimenti specifici alle comuni differenti tipologie di struttura e d'impianto a rischio legionellosi, al fine di fornire una guida nell'applicare il Protocollo del rischio (in particolare le fasi 1 e 2) nella maniera più adeguata alle specificità di ogni singolo caso (rif. Decreto Legislativo 9 Aprile 2008, n. 81 e successive modifiche).

3.2. Valutazione e gestione del rischio nelle strutture turistico-recettive

Molti studi hanno dimostrato l'ampia diffusione del genere *Legionella* nei sistemi idrici delle strutture turistico-recettive e termali (Bonetta et al., 2010, Borella et al., 2005, Bornstein et al., 1989; Castellani et al., 1999; Costa et al., 2010; Erdogan and Arslan, 2007; Kura et al., 2006; Martinelli et al., 2001; Mouchtouri et al., 2007). Per questo motivo e per le importanti ricadute in termini di salute pubblica, di immagine e di implicazioni legali è importante adottare misure di prevenzione e controllo attraverso una attenta valutazione e gestione del rischio.

Valutazione del rischio

Per un'efficace prevenzione è d'obbligo che il gestore di ogni struttura turistico-recettiva effettui con periodicità (biennale, preferibilmente annuale) la valutazione del rischio legionellosi, ovvero del rischio che nella struttura possano verificarsi uno o più casi di malattia. La valutazione deve essere effettuata da una figura competente, responsabile dell'esecuzione di tale attività (ad es. igienista, microbiologo, ingegnere con esperienza specifica, ecc.).

La valutazione del rischio è fondamentale per acquisire conoscenze sulla vulnerabilità degli impianti in termini di:

- potenziali di proliferazione batterica al loro interno e di esposizione ad aerosol d'acqua che essi possono determinare;
- stima del possibile impatto potenzialmente causato dagli impianti sulla salute dei loro utenti e, più in generale dei frequentatori (lavoratori compresi);
- definizione ed implementazione delle contromisure adeguate a mitigare il rischio, con un impegno di sforzi e risorse commisurati al potenziale impatto.

Una corretta valutazione del rischio correlato ad una struttura turistico-recettiva deve partire da un'ispezione degli impianti a rischio, supportata, qualora disponibili, dagli schemi d'impianto aggiornati.

Tale analisi ispettiva deve essere finalizzata ad individuare i punti critici di ciascun impianto a rischio, in considerazione delle condizioni di esercizio e manutenzione che lo caratterizzano. In base all'ispezione ed agli schemi d'impianto disponibili, deve essere valutato quali siano i punti della rete (idrica ed aeraulica) e le specifiche d'esercizio e di controllo che possano determinare un rischio per gli ospiti e per i dipendenti della struttura.

L'ispezione della struttura deve essere accurata, per poter evidenziare eventuali fonti di rischio e valutare, nella loro complessità, gli impianti e non solamente i loro singoli componenti.

Il Rischio legionellosi dipende da un certo numero di fattori. A seguire, si elencano quelli più importanti, di cui tenere sempre in debito conto:

- Temperatura dell'acqua compresa tra 20 e 50°C.
- Presenza di tubazioni con flusso d'acqua minimo o assente (tratti poco o per nulla utilizzati della rete, utilizzo saltuario delle fonti di erogazione).
- Utilizzo stagionale o discontinuo della struttura o di una sua parte.

- 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).
- Vetustà, complessità e dimensioni dell'impianto.
- Ampliamento o modifica d'impianto esistente (lavori di ristrutturazione).
- Utilizzo di gomma e fibre naturali per guarnizioni e dispositivi di tenuta.
- Presenza e concentrazione di *Legionella*, evidenziata a seguito di eventuali pregressi accertamenti ambientali (campionamenti microbiologici).

Nell'Allegato 12, è riportata una Lista di controllo per agevolare la raccolta delle informazioni base di riferimento per l'effettuazione di una preliminare stima dei fattori di rischio presenti in una determinata struttura.

È importante evidenziare che la Lista di controllo rappresenta solo il primo passo di Valutazione del Rischio legionellosi, in quanto è necessario elaborare ed approfondire i dati raccolti, in maniera tale da poter definire, su una scala la gravità del rischio e le relative priorità d'intervento.

Per tale ragione, maggiore è la complessità impiantistica maggiore è l'esperienza di cui il valutatore del rischio deve disporre per definire con precisione il livello di rischio e le relative azioni di gestione necessarie a controllarlo.

Periodicità della valutazione del rischio

I gestori di strutture recettive devono effettuare e revisionare regolarmente la valutazione del rischio, almeno ogni 2 anni (preferibilmente ogni anno) ed ogni volta che ci sia motivo di considerare che la situazione possa essersi modificata (ad esempio: lavori di ristrutturazioni o rifacimento di parti d'impianto, esame batteriologico positivo con valori di legionella che richiedono intervento. Vedi Tabelle 6 e 7). La revisione deve essere documentata formalmente.

La valutazione del rischio, deve, comunque, essere sottoposta a revisione, con carattere d'urgenza, ad ogni segnalazione di un possibile caso di legionellosi.

In base ai risultati complessivi della valutazione del rischio, andrà preparato, anche con l'ausilio di personale tecnico qualificato, un Piano scritto per il controllo e la manutenzione di ciascun impianto a rischio, che specifichi tutti gli interventi da mettere in atto per controllarlo, con particolare riferimento alle procedure di pulizia e disinfezione e loro relativa periodicità.

Gestione del rischio

Per assicurare una riduzione ed un controllo del rischio legionellosi è necessario che i gestori di strutture recettive adottino le misure preventive riportate nelle presenti Linee guida al Capitolo 4.

Nel caso in cui queste misure di controllo non possano essere tutte immediatamente messe in atto e in una struttura turistico-recettiva si valuti la presenza di un potenziale rischio derivante da uno o più impianti (ad esempio la temperatura dell'acqua calda sanitaria è diversa da quella raccomandata oppure vi è la presenza di rami morti nella rete di distribuzione idrica od altro) occorre effettuare celermente un campionamento dell'acqua per la ricerca di *Legionella*.

In relazione alla concentrazione di *Legionella* riscontrata dal campionamento (vedi Tabelle 6 e 7), è necessario definire, sempre con l'ausilio di un'adeguata valutazione del rischio, un

programma per applicare prioritariamente quelle misure correttive tali da contenere il rischio evidenziato.

Fino a quando non sia possibile mettere in atto tutte le misure correttive e di mantenimento richieste dalla valutazione del rischio, il campionamento ambientale dovrà essere ripetuto mensilmente per i primi sei mesi e successivamente con cadenza da stabilirsi sulla base dell'analisi complessiva del rischio.

Se si rendesse necessario effettuare la disinfezione di uno o più impianti, il piano di controllo andrà aggiornato, tenendo conto della periodicità di campionamento da rivalutarsi a seguito della situazione occorsa.

Per le strutture a funzionamento stagionale, il campionamento dovrà, comunque, essere **sempre** effettuato prima della loro riapertura.

Campionamento

Il campionamento deve essere effettuato prima che venga attuato un qualunque intervento di disinfezione o pratica preventiva (pulizia e/o disinfezione con qualunque metodo) oppure a distanza di un tempo congruo dalla sua esecuzione (rif. dopo circa 48 ore dall'avvenuta messa a regime dell'impianto post intervento).

Il protocollo operativo per effettuare il campionamento è descritto nell'Allegato 3.

E' opportuno che il numero di campioni sia proporzionato 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
- 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).

Esiti del campionamento

Nelle Tabelle 6 e 7 che seguono sono descritti gli interventi da effettuare, sulla base delle concentrazioni di *Legionella* rilevate negli impianti idrici, in presenza o meno di casi di legionellosi.

Si sottolinea che il riscontro di positività in un impianto non comprova in modo automatico il nesso di causalità con un eventuale caso di malattia. La *Legionella*, infatti, è un batterio ubiquitario e, quindi, il suo ritrovamento in un sito ambientale non è correlabile in maniera univoca al caso, a meno che gli accertamenti di biologia molecolare non evidenzino un alto grado di omologia con il ceppo isolato dal malato.

La ricerca del batterio ha comunque significato in termini epidemiologici ed anche preventivi nei confronti di altri soggetti esposti.

Si precisa che le indicazioni riportate nelle Tabelle 6 e 7 sono da intendersi valide anche per gli impianti esercitati presso **tutti gli altri siti civili e per tutti i siti industriali**, ad esclusione di:

1. Strutture nosocomiali/sanitarie
2. Impianti che erogano acque termali.
3. Impianti di umidificazione dell'aria che utilizzano acqua.

in quanto, le situazioni indicate al punto 1e 2 devono essere contraddistinte da assenza di *Legionella* (ossia inferiore al limite di rilevabilità del Metodo d'analisi normato utilizzato).

Tabella 6. 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 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 lineeguida siano correttamente applicate. **In presenza di casi:** Verificare che siano in atto le misure di controllo elencate nelle presenti lineeguida, sottopporre 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 7 - Tipi di intervento indicati per concentrazioni di *Legionella* (UFC/L) negli impianti di raffreddamento a torri evaporative o a condensatori evaporativi.

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

Dopo la disinfezione dell'impianto, il controllo microbiologico deve essere ripetuto periodicamente come segue, se non altrimenti disposto:

- dopo circa 48 ore dalla disinfezione.
- Se il risultato è negativo, dopo 1 mese.
- Se anche il secondo controllo risulta negativo, dopo 3 mesi.
- In caso si confermi, anche con il terzo controllo la negatività, dopo 6 mesi o periodicamente, secondo quanto previsto dalla valutazione e dal relativo Piano di controllo del rischio.

Nel caso in cui uno dei campionamenti evidenzi positività, essa dovrà comportare un'ulteriore azione di controllo da valutarsi sulla base delle Tabelle 6-7 e di quanto raccomandato dal responsabile della valutazione del rischio e/o dall'Organo di Controllo.

Il Dipartimento di Prevenzione o altro organo di controllo, per quanto di competenza, può disporre controlli.

Vasche idromassaggio

Le vasche idromassaggio sono note per essere causa di casi di Malattia dei Legionari e, soprattutto quelle di grandi dimensioni, possono rappresentare un rischio anche quando non vengono usate da bagnanti (ad es. anche quando vengono utilizzate a scopo dimostrativo) (Coetzee N. et al, 2012). Molta attenzione deve essere posta alla costruzione, mantenimento e pulizia di tutte le parti e al regolare trattamento dell'acqua per prevenire e controllare il rischio di infezione.

Per vasche idromassaggio si intendono vasche o piscine di piccole o grandi dimensioni in cui l'acqua calda viene continuamente fatta ricircolare attraverso getti ad alta velocità. La temperatura dell'acqua è generalmente superiore ai 30°C e l'agitazione a cui è sottoposta genera

un aerosol sopra la superficie dell'acqua. L'acqua non viene cambiata dopo ogni utilizzatore, ma viene filtrata e trattata chimicamente. Effettuare la sostituzione, almeno giornaliera, di metà dell'acqua delle vasche per idromassaggio collettive (solo per vasche ≤ a 10 m^3),in condizioni di elevato utilizzo e qualora il monitoraggio microbiologico indicato nei punti successivi, abbia individuato rischi specifici. Il trattamento non si applica alle piscine natatorie.

Le piscine devono essere dotate di un filtro a sabbia adatto per piscine e questo dovrebbe essere lavato in contro corrente ogni giorno. Filtri di carta o poliestere non devono essere utilizzati per scopi commerciali, oppure in centri termali o in alloggi per vacanze. La piscina deve essere trattata automaticamente continuamente con un biocida ossidante, preferibilmente cloro, idealmente iniettato a monte del filtro. Il dosaggio a mano non deve essere usato se non in caso di emergenza. Il cloro libero residuo dovrebbe raggiungere e mantenersi nella concentrazione di 0,7-1,5. Il pH dovrebbe essere 7,0-7,6. Le pompe e i sistemi di disinfezione devono essere lasciati in funzione 24 ore al giorno. La concentrazione del disinfettante residuo e il pH dovrebbe essere misurato prima dell'uso e ogni due ore durante l'uso.

Piscine in esposizione presso fiere, centri commerciali, ecc.

, devono essere trattate nello stesso modo. Maggiori dettagli sulla manutenzione di piscine termali sono indicate nel libretto di Gestione di piscine termali: Controllo del rischio di infezione (HPA &HSE 2006) e in Surman-Lee et al. 2007.

Campionamento nelle vasche idromassaggio

Il campionamento per la ricerca di *Legionella* deve essere effettuato una volta ogni 3 mesi, raccogliendo un litro d'acqua dalla piscina e, se presente, dalla vasca di compenso. In alcune indagini sono state riscontrate basse concentrazioni di *Legionella* nell'acqua della piscina al momento del campionamento sebbene nei filtri e nel biofilm all'interno dei tubi erano presenti grandi quantità di *Legionella*. Questo probabilmente riflette il tipo e il posizionamento del trattamento biocida e zone all'interno della tubazione in cui l'effetto biocida non penetrava adeguatamente. Pertanto, è anche importante ispezionare le tubature ei tubi di circolazione dell'aria e dell'acqua per la presenza di biofilm contenente *Legionella*. Campioni di biofilm devono essere raccolti con tamponi dall'interno dei getti e alcune sezioni di questi tubi. Talvolta è possibile farlo rimuovendo un getto ma molto spesso sezioni di tubo dovrà essere tagliato per ottenere l'accesso adeguato.

L'acqua della vasca deve essere testata microbiologicamente una volta al mese per la conta microbica aerobica totale, coliformi, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

La conta microbica aerobica totale a 37°C deve essere <100 UFC/mL e preferibilmente <10 UFC/mL; *Pseudomonas aeruginosa* dovrebbe essere presente in concentrazioni <10 UFC in 100 mL e i coliformi assenti in 100 ml.

Tabella 8 - Tipi di intervento indicati per concentrazioni di *Legionella* (UFC/L) nelle vasche per idromassaggio.

Legionella (UFC/L)	**Intervento richiesto**
Sino a 100	Verificare che le correnti pratiche di controllo del rischio siano correttamente applicate.
Più 100 fino a 1000	L'impianto idrico deve essere ricampionato, dopo aver verificato che le correnti pratiche di controllo del rischio siano correttamente applicate . Drenare l'acqua e riempire di nuovo la vasca. Ripetere il test il giorno successivo e 1-4 settimane più tardi. Se il risultato viene confermato, si deve effettuare una revisione della valutazione del rischio per identificare le necessarie ulteriori misure correttive.
Maggiore di 1000	Chiudere immediatamente la piscina e escludere il pubblico dall'area circostante Effettuare una clorazione shock con 50 mg/L di cloro per un'ora facendo circolare l'acqua e assicurando che tutte le parti dell'impianto siano disinfettate. Svuotare e pulire e disinfettare di nuovo con le stesse modalità. Rivedere la valutazione e il controllo del rischio e effettuare tutte le misure correttive individuate. Riempire la vasca e ripetere il campionamento il giorno successivo e 1-4 settimane più tardi. Tenere chiuso l'impianto fino a che la concetrazione di *Legionella* torni ad essere <100CFU/L e la valutazione del rischio non sia soddisfacente.

3.3. Valutazione e gestione del rischio negli stabilimenti termali

La definizione di acqua termale è indicata nella legge 24/10/2000, n. 323 (art. 2, comma 1, lett. a) acque termali: le acque minerali naturali, di cui al regio decreto 28 settembre 1919, n. 1924, e successive modificazioni, utilizzate a fini terapeutici.

Molte acque termali sono calde (temperatura maggiore di 20°C, alcune anche maggiore di 60°C), ma la sola temperatura non è un parametro che le contraddistingue dalle acque minerali naturali poiché esistono acque termali fredde.

Altra caratteristica delle acque minerali termali è quella di possedere, a volte, una flora batterica propria, che favorisce il formarsi di biofilm sulle superfici di contatto.

Le applicazioni termali individuate nel Decreto del Ministro della Sanità 15 dicembre 1994 sono: fanghi, con o senza "doccia d'annettamento", bagni con o senza idromassaggio, grotte, cure inalatorie (inalazioni, nebulizzazioni e polverizzazioni, aerosol, docce nasali, humages), insufflazioni endotimpaniche, irrigazioni vaginali, docce rettali, cure idroponiche, percorsi vascolari.

In relazione alle caratteristiche delle acque termali, della patologia da trattare, dell'applicazione termale, l'acqua può essere utilizzata tal quale, trattata o diluita con acqua di acquedotto, per ridurne la densità per i bagni, ove il trattamento e/o la diluizione siano espressamente previsti e consentiti nell'ambito del riconoscimento ministeriale dell'acqua termale e delle relative proprietà e utilizzi dell'acqua medesima.

Gli stabilimenti e gli alberghi termali, in ambienti diversi da quelli dedicati alle cure, da anni ormai integrano l'offerta delle prestazioni terapeutiche con quelle più propriamente di benessere. Le prestazioni comprendono: bagni con idromassaggio, docce filiformi, "docce francesi", bagno turco, sauna, fanghi, massaggi, piscine con zone con idromassaggio, ecc.

Le caratteristiche della microflora tipica delle acque termali ed il fatto che queste siano utilizzate a temperature per lo più comprese tra i 30 ed i 40°C costituiscono condizioni favorenti lo sviluppo e la sopravvivenza di *Legionella*.

Le apparecchiature/le cure termali per le quali maggiore è il rischio di trasmissione possono essere:

- cure inalatorie (inalazioni, aerosol-humages, nebulizzazioni, docce nasali), sia per le caratteristiche delle apparecchiature utilizzate che per la tipologia degli utenti (soggetti a rischio per patologie croniche dell'apparato respiratorio);
- bagni con idromassaggio;
- docce d'annettamento (se previste).

Analogamente, rappresentano una fonte di pericolo tutte le prestazioni, erogate con acqua termale o non termale, nei reparti "benessere" degli stabilimenti termali che comportano la formazione di aerosol.

Inoltre, anche negli stabilimenti termali possono rappresentare una fonte di pericolo gli impianti di condizionamento e quelli idrosanitari.

Valutazione del rischio

Anche in questo caso, lo strumento fondamentale per assicurare una riduzione del rischio di contrarre la legionellosi negli stabilimenti termali è costituito dall'adozione di misure preventive. Pertanto i gestori sono tenuti ad eseguire la valutazione del rischio che andrà regolarmente aggiornata e documentata formalmente.

È necessario che tale valutazione ed il conseguente Piano di autocontrollo comprendano, in primo luogo, gli impianti di distribuzione ed erogazione delle acque termali, ma anche gli altri impianti idrici ed aeraulici a rischio.

Periodicità della valutazione del rischio

I gestori di stabilimenti termali devono effettuare e revisionare la valutazione del rischio, ogni anno ed ogni volta che ci sia motivo di considerare che la situazione possa essersi modificata (ad esempio: lavori di ristrutturazioni o rifacimento di parti d'impianto, esame batteriologico positivo con valori di *Legionella* che richiedono intervento).

Gestione del rischio

Di seguito si forniscono le indicazioni principali per la gestione degli impianti d'acqua termale. Per le rimanenti tipologie d'impianto, si deve fare riferimento alle specifiche indicazioni riportate nelle altre sezioni delle presenti Linee guida.

Per quanto attiene all'impianto relativo all'erogazione delle cure termali è necessario:

- Disporre della descrizione dettagliata della rete idrica, al fine di identificare percorsi, eventuali punti di potenziale stagnazione ecc., con particolare analiticità ed accuratezza per quanto riguarda le sezioni delle cure inalatorie.

- Effettuare interventi analoghi a quelli previsti sulle reti idrosanitarie normali, inclusa la disinfezione con mezzi chimici o fisici, cercando di salvaguardia delle caratteristiche delle acque termali.
- Effettuare trattamenti di pulizia, decalcificazione e sostituzione periodica dei soffioni delle "docce d'annettamento".
- Effettuare la regolare manutenzione degli eventuali filtri presenti nelle piscine termali, con particolare riferimento ai lavaggi controcorrente, e prevedere la regolare rigenerazione e sostituzione dei filtri secondo le indicazioni del produttore, in modo da mantenere sempre l'efficienza di ciascun filtro.
- Effettuare la sostituzione, almeno giornaliera, di metà dell'acqua delle vasche per idromassaggio collettive, in condizioni di elevato utilizzo e qualora il monitoraggio microbiologico indicato nei punti successivi, abbia individuato rischi specifici e, comunque, se sostenibile dal giacimento. Il trattamento non si applica alle piscine.
- Effettuare una rigorosa pulizia della superficie delle vasche, dei dispositivi per l'idromassaggio e degli skimmer, per la rimozione dello strato di biofilm microbico.
- Effettuare interventi di formazione del personale sugli aspetti della manutenzione e della pulizia, con evidenziazione della presenza di rischi aumentati rispetto alle normali piscine.
- Effettuare un monitoraggio microbiologico degli impianti termali almeno ogni 6 mesi e comunque ogni volta che ci sia una ripresa dell'attività dopo un periodo di chiusura dello Stabilimento, prevedendo interventi di disinfezione nel caso le indagini ambientali rilevino la presenza di *Legionella*.
- Sostituire i dispositivi per i trattamenti individuali di terapia inalatoria dopo ogni utilizzo da parte di un paziente o sottoporli a sterilizzazione.
- Prevedere che gli impianti che servono i reparti per le cure inalatorie individuali siano sottoposti ad interventi periodici di disinfezione (di regola settimanali) per garantire la rimozione del biofilm, disponendo eventualmente la rotazione nell'utilizzo degli impianti per tutta la durata della stagione termale.

Vasche idromassaggio

Per quanto riguarda la prevenzione ed il controllo della contaminazione da legionella in queste strutture vale quello che è stato detto nello stesso paragrafo dedicato nel capitolo 3.2, fermo restando la verifica in ordine alla sostenibilità dal giacimento.

3.4. Valutazione e gestione del rischio nelle strutture sanitarie

Negli ultimi anni, in molti paesi sono stati descritti, in ospedale o in altre strutture sanitarie, incluse le case di riposo e le residenze sanitarie assistenziali (RSA), casi singoli ed epidemie sostenute da *Legionella*, ed in particolare da *Legionella pneumophila* sierogruppo 1 (Alary and Joly, 1992; Martinelli et al., 2001; Napoli et al., 2010; Scaturro et al., 2007; Yu et al., 2008).

Il rischio di contrarre la legionellosi in ospedale o in altre strutture sanitarie dipende da moltissimi fattori; tra questi, la colonizzazione degli impianti idrici o aeraulici rappresenta una condizione necessaria ma non sufficiente a determinare l'insorgenza di casi.

La frequenza di colonizzazione degli impianti ospedalieri riportata in letteratura è, infatti, rilevante, variando, ad esempio, dal 12% al 73% degli ospedali campionati in paesi anglosassoni (Yu, 1998). Tuttavia, numerosi studi hanno dimostrato come vi possa essere colonizzazione ambientale in assenza di casi di malattia.

Pertanto, l'obiettivo da perseguire è la minimizzazione del rischio di colonizzazione o il suo contenimento piuttosto che l'eliminazione completa di *Legionella* dagli impianti, condizione, quest'ultima, spesso neppure raggiungibile (Stout and Yu, 2003) soprattutto nel lungo periodo.

Ciò non vale per i reparti che ospitano pazienti profondamente immunocompromessi: in questo caso, l'incapacità del sistema immunitario di rispondere a una eventuale esposizione rende necessari interventi atti a garantire l'assenza di *Legionella* (non rilevabilità).

Valutazione del rischio

La valutazione del rischio deve essere effettuata in ciascuna struttura sanitaria, tenendo conto delle caratteristiche ambientali e impiantistiche, come già riportato nel paragrafo relativo alle strutture turistico-recettive (paragrafo 3.2), e sviluppando maggiormente la raccolta e l'elaborazione dei dati inerenti la tipologia di popolazione ospitata e assistita, le prestazioni erogate e i precedenti epidemiologici (Tabella 9).

Tabella 9 - Fattori da considerare nella valutazione del rischio nelle strutture sanitarie

Tipologia di pazienti assistiti	Il rischio di sviluppare la legionellosi, dopo esposizione a *Legionella* nell'ambiente, è: 1. molto elevato: in pazienti profondamente immunodepressi, quali: • pazienti sottoposti nel corso del ricovero a trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche o a trapianto di organo solido. • pazienti sottoposti a chemioterapia particolarmente immunodepressiva (ad es. per leucemia mielogena acuta dell'infanzia). • pazienti con granulocitopenia di lunga durata (PMN neutrofili ≤ 500/mL). • pazienti affetti da tumore sottoposti a chemioterapia preventiva e trattamento corticosteroideo ad alte dosi (> 5 mg/kg di prednisone per più di 5 giorni) o prolungato (0,5 mg/kg di prednisone per 30 giorni o più o equivalenti). 2. aumentato in presenza di patologie, condizioni individuali, quali: • abitudine al fumo • diabete mellito, scompenso cardiaco, BPCO, nefropatie • intervento chirurgico in anestesia generale • tumori maligni • infezione da HIV • trattamento con corticosteroidi, chemioterapia antitumorale, radioterapia, farmaci anti–TNF- α (Tumor Necrosis Factor-α) o altri immunosoppressivi, che, per durata e/o dosaggio dei farmaci, non è tale da indurre un'immunodepressione profonda • aumentare dell'età • etilismo cronico • tossicodipendenza per via venosa Complessivamente, le condizioni di cui al punto 2 sono molto diffuse nella popolazione generale, e di conseguenza anche tra i pazienti ospedalizzati. Pertanto, più che per definire i reparti a rischio, vanno considerati come fattori di rischio individuali.
Pratiche sanitarie che aumentano il rischio	• Parto in acqua. • Pratiche sanitarie inerenti le vie aeree: intubazione, ventilazione, aspirazione, aerosol, ecc. (si veda anche il paragrafo: "Prevenzione della legionellosi associata a procedure assistenziali).
Storico antecedente della struttura	Il rischio di trasmissione di *Legionella* può aumentare in una qualsiasi delle condizioni riportate di seguito: • Precedenti casi di legionellosi nosocomiale • Isolamento in passato di *Legionella* dagli impianti idrici od aeraulici.

Sulla base degli elementi elencati nella tabella sopra riportata, le aree assistenziali sono suddivise in diverse categorie di rischio:

Reparti che assistono pazienti a rischio molto elevato (Centri trapianto, Oncologie, Ematologie).

Questi devono essere classificati ad alto rischio e l'obiettivo deve essere quello di garantire costantemente l'assenza di colonizzazione di *Legionella* negli impianti.

Reparti che assistono pazienti a rischio aumentato (Medicine, Pneumologie, Geriatrie, Chirurgie, ecc.).

L'obiettivo generale di prevenzione e controllo sarà definito anche in funzione dei precedenti storici quali ad esempio la presenza di casi di sospetta o accertata origine nosocomiale ed il livello di contaminazione.

Le procedure assistenziali in genere e, fra queste quelle correlate all'assistenza respiratoria ed all'igiene personale, devono essere valutate in merito al rischio potenziale di esporre il paziente alla possibilità di contrarre l'infezione da *Legionella* durante il periodo di ricovero nelle strutture sanitarie.

La Tabella 10 sintetizza le possibili fonti ed i meccanismi di trasmissione della *Legionella* correlata a procedure assistenziali (Guidelines for Preventing Health-Care-Associated Pneumonia, 2004; Singh et al., 2004).

Tabella 10 - Fonti e meccanismi di trasmissione della legionellosi correlata a procedure assistenziali

L'**esposizione** al rischio avviene per via respiratoria:

- per inalazione dei microrganismi da goccioline di acqua contaminata aerosolizzata che può essere prodotta da docce, umidificatori dell'aria
- per contaminazione dei presidi usati per la terapia respiratoria o dispositivi medici usati sulle vie respiratorie
- attraverso meccanismi di aspirazione dell'acqua (pazienti portatori di sonde nasogastriche)

Non è mai stata dimostrata trasmissione interumana.

Procedure coinvolte

Procedure che coinvolgono l'apparato respiratorio, invasive e non, e che necessitano di acqua per la sterilizzazione degli strumenti o per il loro funzionamento.

Possibili pratiche a rischio

- Broncoscopia
- Broncoaspirazione
- Broncolavaggio
- Ventilazione assistita
- Intubazione orotracheale
- Tracheostomia
- Sondino naso-gastrico
- Trattamenti odontoiatrici
- Aerosol terapia
- Ossigeno terapia
- Parto in acqua

Esempi di articoli semicritici usati sul tratto respiratorio

- Maschere facciali o tubi endotracheali
- Tubi del circuito inspiratorio ed espiratorio
- Raccordo ad Y
- Pallone reservoir per la rianimazione
- Umidificatore
- Circuiti respiratori di ventilatori meccanici
- Spirometria e boccagli
- Broncoscopi e loro accessori (pinze per biopsia e spazzolini per campioni devono essere sterili)
- Tubi endotracheali ed endobronchiali
- Lame del laringoscopio
- Boccagli e tubi per le prove di funzionalità respiratoria nebulizzatori e reservoir maschere ed occhialini per l'ossigenazione
- Sonde dell'analizzatore di CO_2 e dei monitor della pressione dell'aria palloni per la rianimazione manuale
- Mandrini per intubazione sondini per aspirazione
- Sensori di temperatura

Periodicità della valutazione del rischio

La valutazione del rischio nelle strutture sanitarie deve essere revisionata almeno con **periodicità annuale** e documentata formalmente. Inoltre deve essere ripetuta ogni volta che vi siano modifiche degli impianti, della tipologia di pazienti assistiti o della situazione epidemiologica della struttura interessata o, infine, in caso di reiterata ed anomala presenza di *Legionella* negli impianti riscontrata a seguito dell'attività di monitoraggio.

Gestione del rischio

Per assicurare una riduzione ed un controllo del rischio legionellosi è necessario che vengano adottate le misure preventive riportate nelle presenti Linee guida al Capitolo5.

Nel caso in cui le misure di controllo non possano essere tutte immediatamente messe in atto e si valuti la presenza di un potenziale rischio derivante da uno o più impianti (ad esempio la temperatura dell'acqua calda sanitaria è diversa da quella raccomandata oppure vi è la presenza di rami morti nella rete di distribuzione idrica od altro) occorre effettuare celermente un campionamento dell'acqua per la ricerca di *Legionella*.

In relazione alla concentrazione di *Legionella* riscontrata dal campionamento è necessario definire, sempre con l'ausilio di un'adeguata valutazione del rischio, un programma per applicare prioritariamente quelle misure correttive tali da contenere il rischio evidenziato.

Fino a quando non sia possibile mettere in atto tutte le misure correttive e di mantenimento richieste dalla Valutazione del rischio, il campionamento ambientale dovrà essere ripetuto mensilmente per i primi sei mesi e successivamente con cadenza da stabilirsi sulla base dell'analisi complessiva del rischio.

Se si rendesse necessario effettuare la disinfezione di uno o più impianti, il piano di controllo andrà aggiornato, tenendo conto della periodicità di campionamento da rivalutarsi a seguito della situazione occorsa.

Campionamento

I reparti che ospitano pazienti profondamente immunocompromessi (trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche, trapianto di organo solido) devono avere impianti privi di *Legionella*.

Inoltre in questi reparti deve essere eseguito un campionamento ambientale almeno **trimestrale** per controllare l'assenza di colonizzazione con *Legionella*.

Il protocollo operativo per effettuare il campionamento è descritto nell'Allegato 3.

E' opportuno che il numero di campioni sia proporzionato 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
- fondo serbatoio/i
- almeno 3 punti rappresentativi (ovvero i più lontani nella distribuzione idrica e i più freddi)
- Per strutture con numero di posti letto superiore a 150, considerare almeno un punto di prelievo aggiuntivo ogni 100 posti letto in più.

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).

- Per strutture con numero di posti letto superiore a 150, considerare almeno un punto di prelievo aggiuntivo ogni 100 posti letto in più.

Quando viene diagnosticato un caso di legionellosi, in un qualsiasi reparto o struttura sanitaria, è necessario eseguire l'indagine epidemiologica ed il campionamento ambientale.

Sulla base di questi aspetti, si forniscono le seguenti indicazioni:

- Tutti gli ospedali che ospitano reparti ove vengono ricoverati pazienti che devono essere sottoposti a trapianto allogenico di cellule ematopoietiche staminali o di organo solido, devono pianificare interventi specifici per garantire in questi reparti l'assenza di colonizzazione degli impianti di trattamento dell'aria e l'assenza di *Legionella*(non rilevabile in relazione al metodo analitico utilizzato e comunque sempre <100 UFC/L) nell'acqua erogata. Quanto indicato per i Centri trapianto si raccomanda sia esteso anche ai reparti che assistono le altre tipologie di pazienti a rischio molto elevato.
- L'assenza di *Legionella* deve essere garantita anche nell'acqua utilizzata per il parto in vasca.

Per gli altri reparti si raccomanda una ricerca attiva di *Legionella* **almeno ogni sei mesi**, e annualmente l'esecuzione/riesame della valutazione del rischio. In tutti i reparti deve comunque essere garantita la ricerca dell'antigene urinario in tutti i casi di polmonite comparsa dopo il ricovero.

Esiti del campionamento

Per decidere, sulla base dei risultati dei monitoraggi microbiologici, la necessità di bonifiche immediate negli impianti idrici o aeraulici contaminati, sono descritti in letteratura due principali tipi di criteri: la concentrazione di *Legionella* e la percentuale di campioni positivi.

Le indicazioni riportate nelle Tabelle 6 e 10 forniscono un connubio tra i due criteri di valutazione delle risultanze analitiche, riportati in letteratura. Questo al fine di migliorare il controllo del rischio legionellosi e per rendere più accurate le eventuali azioni di rimedio.

Sono da escludersi dalle indicazioni riportate in 1i seguenti impianti:

1. Erogazioni dei Reparti Ospedalieri che assistono pazienti a rischio molto elevato
2. Alimentazioni idriche a servizio delle vasche per il parto in acqua.

Tabella 11 - Tipi di intervento indicati per concentrazione di *Legionella* (UFC/L) negli impianti idrici a rischio legionellosi, esercitati in strutture nosocomiali/sanitarie.

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

Prevenzione della legionellosi correlata a procedure assistenziali

Procedure inerenti le vie respiratorie

Quando è possibile, per trattare le **attrezzature ed i dispositivi semicritici** (articoli che vengono in contatto diretto o indiretto con le mucose delle basse vie respiratorie) non alterabili dal calore e dall'umidità, **usare la sterilizzazione a vapore o un alto livello di disinfezione.** Usare metodi di sterilizzazione a bassa temperatura per le attrezzature o i dispositivi sensibili al calore o all'umidità. La disinfezione deve essere seguita da un appropriato risciacquo, asciugatura e confezionamento prestando attenzione a non contaminare gli articoli durante tale processo.

Usare **acqua sterile per risciacquare** i nebulizzatori e le altre attrezzature semicritiche per l'assistenza respiratoria, dopo che sono stati puliti e/o disinfettati. Se questo non è possibile risciacquare lo strumento con acqua filtrata (es. acqua che è passata attraverso un filtro di 0,2 µm) e quindi risciacquare con alcool isopropilico ed asciugare con aria forzata o in un essiccatoio.

Usare **solo acqua sterile** (non acqua distillata che è non sterile) per riempire i serbatoi dei dispositivi usati per l'umidificazione e nebulizzazione.

Seguire le specifiche istruzioni del produttore per l'uso degli umidificatori per l'ossigeno.

Non utilizzare umidificatori ambientali di largo volume che producono aerosol (es. umidificatori tipo venturi, a ultrasuoni o disco rotante e che sono quindi veri nebulizzatori) a meno che non sia possibile sterilizzarli o sottoporli a disinfezione di alto livello almeno una volta al giorno e riempirli solo con acqua sterile.

Tra un trattamento e l'altro sullo stesso paziente pulire, disinfettare, risciacquare con acqua sterile (se il risciacquo è necessario) e asciugare i nebulizzatori di farmaci di piccolo volume in-line o manuali.

Parto in acqua

Il sistema di alimentazione dell'apposita vasca deve essere privo di *Legionella*, in analogia con quanto indicato per i reparti a rischio molto elevato. Le vasche per il parto, preferibilmente progettate per questo specifico uso, dopo il parto devono essere ben pulite e successivamente disinfettate con prodotti adeguati (ad es. clorodonatori). Un intervento aggiuntivo di pulizia e disinfezione anche prima del parto, può essere opportuno se è trascorso molto tempo dall'ultimo trattamento disinfettante (ad es. più di 72 ore).

Procedure odontoiatriche

I rischi legati alle pratiche odontoiatriche e le relative misure di contenimento sono descritte nel capitolo 6.

Misure per pazienti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche

I pazienti profondamente immunocompromessi possono sviluppare legionellosi anche se esposti a cariche molto basse di *Legionella*. Per questo motivo il contatto con acqua contaminata, anche nell'esecuzione di semplici pratiche, può rappresentare un rischio per i pazienti. Tra le pratiche a rischio vi sono:

- igiene del cavo orale (lavarsi i denti, lavare le protesi dentarie)
- igiene personale (parziale, totale, doccia, vasca, ecc.)
- assunzione di acqua della rete idrica e ghiaccio prodotto con acqua della rete idrica
- pulizia ambientale.

Le principali misure raccomandate per prevenire la legionellosi correlata a procedure assistenziali nei pazienti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche, qualora sia rilevata *Legionella* nell'acqua potabile delle Unità di trapianto e finché la *Legionella* non sia più isolata nelle colture ambientali, sono le seguenti:

- non consentire di eseguire la doccia ai pazienti in fase di grave immunocompromissione
- usare acqua sicuramente non contaminata con *Legionella* (ad es. filtrata o sterile) per le spugnature dei pazienti
- fornire ai pazienti acqua sterile per lavarsi i denti, per bere o per il lavaggio dei tubi naso-gastrici
- non utilizzare acqua proveniente da rubinetti che erogano acqua potenzialmente contaminata da *Legionella* nelle stanze dei degenti, per evitare di creare aerosol infetti.

Diagnosi di legionellosi e sorveglianza attiva

Diagnosi

L'incidenza di legionellosi viene spesso sottostimata per diversi motivi:

- il basso sospetto diagnostico da parte dei clinici;
- la non disponibilità, nella struttura o in service, di esami di laboratorio specifici, quali la ricerca dell'antigene urinario e la coltura;
- la presentazione della malattia con quadri clinici atipici, evento più frequente tra i pazienti immunocompromessi (localizzazioni diverse da quella polmonare, quali tessuti molli o endocardio, sieroconversione ritardata).

Il fatto che la diagnosi eziologica di infezione da *Legionella* non sia tempestiva o non venga per nulla effettuata ha due principali conseguenze:

- la mancata prescrizione di un trattamento antibiotico mirato;
- la mancata attivazione degli opportuni interventi di controllo, sia in ambito assistenziale che comunitario.

Pertanto, tra gli obiettivi di un piano di controllo della legionellosi correlata all'assistenza occorre:

- garantire che tutti gli ospedali abbiano accesso ai test di laboratorio appropriati per la diagnosi di legionellosi;
- assicurare la possibilità di eseguire il test dell'antigene urinario, all'interno dell'ospedale o in *service*, nell'arco di 24-48 ore (esecuzione del test e refertazione);
- tutti gli ospedali che hanno reparti per trapianto di cellule staminali o di organo solido devono avere la possibilità di eseguire la coltura per *Legionella*. Questa esigenza deriva dal fatto che tra i pazienti immunocompromessi sono frequenti casi di legionellosi sostenuti da ceppi diversi da *L. pneumophila* di sierogruppo 1 e, quindi, la ricerca dell'antigene urinario non è sufficientemente sensibile;
- tutti gli ospedali che non ospitano reparti per trapianto di cellule staminali o di organo solido devono, comunque, assicurare la possibilità di eseguire la coltura per *Legionella* (in quanto rappresenta lo standard diagnostico) ma ciò può avvenire anche in *service* o mediante invio dei campioni ai laboratori clinici di riferimento regionale
- incrementare nei clinici il sospetto diagnostico per la legionellosi associata a cure sanitarie.

In tutti i casi di polmonite insorta dopo l'ingresso in ospedale, a maggior ragione se in pazienti con aumentato rischio di contrarre la malattia (Tabella 9), nella diagnosi differenziale deve essere sempre considerata la legionellosi per la quale devono essere richiesti i test di laboratorio opportuni.

Deve essere pertanto assicurata la disponibilità e deve essere periodicamente verificato l'effettivo utilizzo dei test diagnostici di laboratorio da parte dei medici.

Sorveglianza attiva

Oltre che promuovere l'esecuzione di test di laboratorio per la diagnosi di legionellosi, è altresì importante rendere operanti sistemi di sorveglianza attiva (ad esempio la segnalazione a partire dai laboratori) che informino tempestivamente i responsabili dei gruppi operativi di controllo delle infezioni nosocomiali. Questi potranno così tempestivamente verificare se si tratti di casi di legionellosi in pazienti che erano stati ricoverati in ospedale senza questa patologia o con un precedente ricovero in data compatibile con il periodo di incubazione.

Indagine epidemiologica

In presenza di uno o più casi di legionellosi di origine nosocomiale è necessario che il Comitato per le Infezioni Ospedaliere (CIO), e il personale addetto alla gestione e alla manutenzione degli impianti collaborino strettamente tra loro.

Occorre innanzitutto:

- valutare la pertinenza della segnalazione, eventualmente eseguendo un secondo esame di laboratorio per la conferma diagnostica;
- definire il caso in base ai criteri clinici e di laboratorio riportati al paragrafo 2.1;
- verificare la sussistenza dei criteri temporali utili a definire il caso come nosocomiale;
- valutare se si è in presenza di un caso sporadico o di un cluster, sia tramite un'analisi delle segnalazioni nei 24 mesi precedenti, sia tramite una eventuale revisione dei casi di polmonite nosocomiale diagnosticati nell'ultimo periodo.

Cluster nosocomiale di legionellosi

In presenza di un cluster (2 o più casi nell'arco di 2 anni) l'indagine deve seguire le seguenti tappe:

- conferma di laboratorio della diagnosi. Si raccomandano, qualora possibili, l'isolamento colturale e la tipizzazione del microrganismo in causa;
- notifica tempestiva alle autorità sanitarie, secondo le indicazioni riportate nei sistemi di sorveglianza;
- inchiesta epidemiologica (ricerca dell'esposizione, luoghi frequentati e trattamenti a rischio);
- ricerca di altri possibili casi; verifica della presenza (o, in caso negativo, adozione) di un protocollo per la ricerca di *Legionella* in tutti i casi di polmonite nosocomiale. Se la situazione è di particolare gravità, può essere necessario condurre un'indagine retrospettiva (titoli anticorpali su sieri conservati, ricerca dell'antigene urinario in malati recenti);
- descrizione della distribuzione nel tempo e nello spazio dei casi confermati e dei casi presunti. Rappresentazione grafica della curva epidemica. Descrizione dei trattamenti a rischio e del tipo di acqua utilizzata per i differenti trattamenti;
- ricerca di esposizioni comuni;
- formulazione di ipotesi sulla possibile origine dell'infezione;

- indagini ambientali sulla rete idrica e le attrezzature sospette, mirate in base alle ipotesi emerse dallo studio descrittivo;
- confronto dei ceppi di *Legionella* isolati dai malati con quelli isolati dall'ambiente; per la tipizzazione e il confronto, inviare gli isolati al laboratorio di riferimento;
- programmazione di uno studio epidemiologico-analitico nei casi in cui l'origine del cluster/epidemia resta difficile da identificare,

Indagine ambientale

A seguito di ogni caso segnalato:

- deve essere effettuata una verifica sulle condizioni di funzionamento e di manutenzione della rete idrosanitaria (in particolar modo sui punti a rischio: rami morti, terminali scarsamente utilizzati, pulizia e disinfezione dei serbatoi e della rete idrica, pulizia dei terminali, ecc.) e della rete aeraulica;
- deve essere effettuata una valutazione sulle condizioni di eventuale utilizzo di dispositivi medici a rischio;
- devono essere programmati controlli microbiologici ambientali per la ricerca di *Legionella;*
- devono essere presi in considerazione gli impianti tecnologici (idrici ed aeraulici), nonché gli eventuali dispositivi medici in uso, secondo quanto emerso dall'inchiesta epidemiologica e dalle osservazioni dei tecnici del settore interessato.

Le modalità di campionamento della rete idrica dovranno essere volte a monitorare l'impianto idrico nella sua completezza (serbatoi, ricircolo, punti più distali dai serbatoi d'accumulo, ecc.).

In caso di riscontro di contaminazione degli impianti con *Legionella*, occorre valutare la necessità di eventuali interventi di disinfezione, secondo quanto indicato nelle Tabelle 7 e 10 utilizzando, se necessario, uno o più dei metodi illustrati a seguire nelle presenti Linee guida.

Per impianti in esercizio presso strutture nosocomiali, la frequenza dei controlli microbiologici, a seguito degli interventi di disinfezione, è stabilita sulla base del livello di contaminazione riscontrato e di rischio: di norma, in caso di riscontri negativi, i controlli, successivi alla prima fase di monitoraggio microbiologico post disinfezione, dovrebbero essere eseguiti, per il primo anno a seguire, almeno una volta a trimestre. Se persiste la negatività, nel secondo anno a seguire dovrebbero essere almeno semestrali, dopo di che possono essere programmati secondo le risultanze della valutazione del rischio.

Se dopo l'intervento di disinfezione i campioni sono ancora positivi, deve essere effettuato un nuovo intervento e due successivi campionamenti immediatamente dopo la disinfezione e a distanza di circa 48 ore dalla stessa.

Tale procedura di rimedio deve essere ripetuta fino alla non rilevabilità della *Legionella* nei campioni di controllo microbiologico, ricadendo, a seguire, nella situazione descritta precedentemente in merito agli esiti dell'analisi microbiologica.

Comunicazione e formazione

Data la peculiarità delle strutture sanitarie, gli interventi fortemente raccomandati sono:

- Formare i medici a mantenere elevato il sospetto per la polmonite da *Legionella* associata a pratiche assistenziali e ad usare appropriati test diagnostici.
- Mantenere elevato il sospetto di polmonite da *Legionella* nei pazienti trapiantati, con polmonite nosocomiale, anche quando gli accertamenti di sorveglianza ambientale non dimostrano presenza di *Legionella*.

- Formare il personale di assistenza, il personale addetto al controllo delle infezioni e quello addetto alla gestione e manutenzione degli impianti, sulle misure di controllo delle legionellosi associata alle pratiche assistenziali.
- Comunicare formalmente ai reparti gli esiti della valutazione del rischio.
- Garantire la tracciabilità delle attività svolte attraverso adeguate registrazioni.

4. METODI DI PREVENZIONE E CONTROLLO DELLA CONTAMINAZIONE DEL SISTEMA IDRICO

Nell'Allegato 13 si riporta , una rassegna dei metodi attualmente più utilizzati (ACHD, 1997; AWT T C o, 2003; EPA, 2001; EWGLINet and EWGLI, 2005; Health D o, 2010; HSC, 2000) che potranno essere adottati, singolarmente o in combinazione, previa valutazione del singolo impianto, del sistema idrico e dell'ambiente nel quale si opera. Ciascun trattamento descritto presenta limitazioni nell'uso e nell'efficacia temporale e, nel caso di ospedali, stabilimenti termali e ricoveri per anziani, risulta fortemente influenzato dalle caratteristiche progettuali dell'impianto in esame. Ciò implica la necessità di selezionare la strategia più idonea al trattamento delle differenti parti del sistema da disinfettare. I metodi descritti risultano, comunque, scarsamente efficaci nelle aree di ristagno o in presenza di problemi di ricircolo all'interno del sistema di distribuzione. La presenza di biofilm e di depositi di calcare, la corrosione, i materiali impiegati nella rete idrica e le caratteristiche chimiche e chimico-fisiche dell'acqua (quali, ad esempio, il pH, la temperatura, la torbidità, la durezza e la sostanza organica disciolta) possono interferire con il metodo adottato, riducendone l'efficacia. Il risultato di ciascun trattamento è inoltre influenzato dalle condizioni operative adottate; quest'ultime devono essere costantemente monitorate ed eventualmente corrette anche in base ai risultati derivanti dai controlli microbiologici. Per il monitoraggio della concentrazione dei disinfettanti chimici e l'analisi batteriologica è necessario il ricorso a personale qualificato.

I trattamenti di disinfezione chimica descritti nella presente rassegna potrebbero rendere l'acqua calda sanitaria temporaneamente o permanentemente non conforme ai requisiti di qualità richiesti dalla normativa vigente sulle acque destinate al consumo umano. Nel caso in cui ciò si verifichi è necessario adottare alcune limitazioni d'uso come, ad esempio, interdire il suo impiego nella preparazione dei pasti. E' inoltre necessario informare adeguatamente gli operatori sanitari e l'utenza.

Anche eventuali nuove tecniche di disinfezione dovranno essere compatibili con i criteri di potabilità dell'acqua stabiliti dalla legge e sottoposte ad una valutazione da parte del Ministero della Salute.

5. INDICAZIONI PER LA PROGETTAZIONE, LA REALIZZAZIONE E LA GESTIONE DEGLI IMPIANTI

5.1. Introduzione

La prevenzione delle infezioni da *Legionella* si basa essenzialmente:

- sulla corretta progettazione e realizzazione degli impianti tecnologici che comportano un riscaldamento dell'acqua e/o la sua nebulizzazione **(impianti a rischio)**. Sono considerati tali, in primis, 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 distribuiscono ed erogano acque termali, le piscine e le vasche idromassaggio.
- sull'adozione di misure preventive (manutenzione e, all'occorrenza, disinfezione) atte a contrastare la moltiplicazione e la diffusione di *Legionella* negli impianti a rischio.

Per quanto tali misure non garantiscano che un sistema o un suo componente siano privi di *Legionella*, esse contribuiscono a diminuire la probabilità di una contaminazione batterica grave.

Fermo restando il rispetto delle regole previste da norme e leggi esistenti (norme UNI, ecc.) per la costruzione e la manutenzione delle varie tipologie di impianti, nel presente capitolo si richiamano le principali indicazioni che dovrebbero essere rispettate per un ottimale controllo della contaminazione da *Legionella*.

5.2. Impianti idro-sanitari

Nelle strutture di nuova edificazione e in quelle soggette a ristrutturazione totale, le reti dell'acqua fredda e della acqua calda sanitaria devono essere adeguatamente distanziate tra loro e da altre fonti di calore oltre che adeguatamente isolate termicamente (Approved Code of Practice and guidance (ACoP), 2000).

Le reti, inoltre, devono essere il più possibile lineari, evitando tubazioni con tratti terminali ciechi e senza circolazione dell'acqua.

Nella rete dell'acqua fredda il rischio di colonizzazione e crescita di *Legionella* è trascurabile se la temperatura dell'acqua non supera i 20°C.

I serbatoi di accumulo, quando installati, devono essere facilmente ispezionabili al loro interno e disporre, alla base, di un rubinetto, tramite il quale effettuare le operazioni di spurgo del sedimento.

Un secondo rubinetto, necessario per prelevare campioni di acqua da sottoporre ad indagini analitiche, posto ad un'altezza non inferiore a 1/3 del serbatoio, deve essere installato sul serbatoio se quello di cui al punto precedente non dovesse risultare adatto allo scopo. Tutti i nuovi impianti d'acqua calda sanitaria, che prevedono l'utilizzo di boiler/serbatoi centralizzati, devono essere dotati di tali rubinetti.

La tipologia dei materiali (Rogers et al., 1994), utilizzati per la realizzazione dell'impianto, deve garantire la possibilità di eseguire adeguati trattamenti di disinfezione.

Copie dello schema dettagliato della rete idrica devono accompagnare la presentazione del progetto edilizio e restare a disposizione del proprietario/gestore/amministratore della struttura per la gestione degli interventi di manutenzione ordinaria e per eventuali richieste dei soggetti

titolati ad eseguire controlli. Ogni modifica delle reti deve comportare l'aggiornamento delle suddette planimetrie.

Negli impianti d'acqua calda sanitaria centralizzati il rischio di colonizzazione e crescita di *Legionella* può essere minimizzato mantenendo costantemente la temperatura di distribuzione dell'acqua al di sopra di 50°C.

Pertanto oltre a quanto sopra riportato, nelle strutture con impianto centralizzato, si raccomanda la realizzazione della rete di ricircolo dell'acqua calda correttamente dimensionata, tenuto conto della specifica del mantenimento dei 50°C.

Per evitare salti termici lungo la distribuzione idrica e raffreddamenti eccessivi dell'acqua, la rete di ricircolo deve essere pertanto adeguatamente bilanciata.

Negli impianti con rete di ricircolo la temperatura dell'acqua calda sanitaria:

- deve essere mantenuta a $T \geq 60°C$ nei serbatoi di accumulo,
- non deve scendere sotto i 50°C alla base di ciascuna colonna di ricircolo.

Ove si evidenziasse il rischio di ustioni dovranno essere prese adeguate precauzioni per minimizzare tale rischio, ad esempio mediante l'installazione di opportune tutele quali le valvole termostatiche di miscelazione (TMV) in prossimità o sui terminali di erogazione.

Tuttavia, se vengono istallate TMV, queste dovrebbero essere poste quanto più vicine al punto d'uso. Idealmente una TMV non dovrebbe servire più di un rubinetto e la distanza tra rubinetto e TMV dovrebbe essere inferiore ai 2 metri. Dove una singola TMV serve molti rubinetti o docce, in attesa di una modifica dell'impianto che garantisca una TMV per ciascun punto distale, è necessario assicurare che esse vengano frequentemente flussate.

Si ribadisce che, qualora le temperature di sicurezza non possano essere rispettate a causa di problemi tecnici, occorre predisporre un sistema di disinfezione alternativo, al fine di compensare tale mancanza ed ovviare all'impossibilità di controllare il rischio proliferazione batterica con il ricorso a temperature al di fuori dell'intervallo di sviluppo delle Legionelle (20 - 50°C).

E' inoltre da tener presente l'importanza nella corretta progettazione delle reti idriche al fine di assicurare un corretto bilanciamento idrodinamico (flusso dell'acqua), una riduzione al minimo del volume accumulato e un'opportuna scelta dei materiali in relazione ai trattamenti di prevenzione e controllo della contaminazione microbiologica.

5.3. Impianti aeraulici

Prese d'aria esterna

Le prese d'aria esterna, se poste su pareti verticali non protette, devono essere dimensionate per velocità non superiori a 2 m/s e devono essere dotate di efficaci sistemi per evitare che l'acqua penetri al loro interno. Occorre inoltre che siano ubicate ad idonee distanze (distanza minima 20 metri, preferibilmente superiore ai 50 metri o ancora superiore in presenza di venti prevalenti) da camini e da altre fonti di emissione di aria potenzialmente contaminata, con particolare riferimento a torri di raffreddamento, condensatori evaporativi e bocche di espulsione dell'aria dello stesso o di altri impianti aeraulici.

Filtri

Il costo di una filtrazione più efficace è molto inferiore a quello della pulizia dei componenti delle reti di distribuzione. Si consiglia pertanto di installare filtri di classe Eurovent EU7 a

monte delle unità di trattamento dell'aria e ulteriori filtri di classe EU8/9 a valle di dette unità e comunque a valle degli eventuali silenziatori. Sui sistemi di ripresa dell'aria dovrebbero essere installati filtri almeno di pari classe .

Ove la tipologia dei locali o della struttura lo richieda dovranno essere installati filtri a maggiore efficienza.

Sistemi di umidificazione

Non è consentito l'utilizzo di sistemi di umidificazione che possono determinare ristagni d'acqua. Si sconsiglia l'uso di umidificatori con ricircolo d'acqua interno all'Unità di Trattamento dell'Aria.

Batterie di scambio termico

Nel caso di batterie di raffreddamento, le superfici alettate ed in particolare le vasche di raccolta della condensa costituiscono i luoghi dove maggiormente possono proliferare microrganismi e muffe. Risulta pertanto necessario installare vasche dotate della dovuta inclinazione in modo da evitare ristagni, e realizzarle con materiali anticorrosivi per agevolarne la pulizia. Gli scarichi delle vasche devono essere adeguatamente sifonati.

Silenziatori

I materiali fonoassorbenti impiegati di solito sono del tipo poroso e fibroso, e quindi particolarmente adatti a trattenere lo sporco e di difficile pulizia. Si raccomanda quindi l'impiego di finiture superficiali che limitino tali inconvenienti, anche se questo porta ad una maggiore estensione delle superfici e quindi a costi più elevati. Inoltre si raccomanda di osservare le distanze consigliate dai costruttori tra tali dispositivi e gli umidificatori.

Canalizzazioni

Ai fini di una buona manutenzione delle condotte dell'aria occorre progettare, costruire ed installare i sistemi aeraulici tenendo anche presente le seguenti esigenze manutentive:

- prevedere la possibilità di drenare efficacemente i fluidi usati per la pulizia
- evitare di collocare l'isolamento termico all'interno delle condotte, considerata la difficoltà di pulire in modo efficace l'isolante stesso
- dotare (a monte ed a valle) gli accessori posti sui condotti (serrande, scambiatori, ecc.) di apposite aperture di dimensioni idonee a consentire la loro pulizia, e di raccordi tali da consentirne un rapido ed agevole smontaggio e rimontaggio, assicurandosi che siano fornite accurate istruzioni per il montaggio e lo smontaggio dei componenti
- ridurre al minimo l'uso di condotti flessibili corrugati e utilizzare materiali sufficientemente solidi per permetterne una facile pulizia meccanica
- utilizzare terminali smontabili per la mandata e il recupero dell'aria.

5.4. Impianti di raffreddamento a torri di evaporative e condensatori evaporativi

Le torri di raffreddamento ed i condensatori evaporativi sono apparecchiature che consentono di raffreddare un flusso d'acqua riscaldatosi durante il raffreddamento di un impianto tecnologico. Il rischio è collegato alla presenza nell'acqua di *Legionella* ed alla dispersione in atmosfera di un aerosol contaminato, costituito da gocce di varie dimensioni.

Tali apparecchiature, componenti importanti di molti processi industriali e commerciali nonché di impianti di condizionamento centralizzati, in conseguenza di quanto sopra esposto, non devono essere installate:

- in prossimità di finestre, prese d'aria a parete di edifici, prese d'aria di impianti di condizionamento, in modo da evitare che l'aria di scarico proveniente dalle torri e dai condensatori evaporativi entri negli edifici;
- in zone destinate a frequentazione o raccolta di pubblico.

In particolare, le bocche di scarico delle torri e dei condensatori devono essere posizionate almeno 2 metri al di sopra della parte superiore di qualsiasi elemento o luogo da proteggere (finestre, prese d'aria, luoghi frequentati da persone) o ad una distanza, in orizzontale, di almeno 20 metri (preferibilmente superiore ai 50 metri o più elevate in presenza di venti dominanti). Per il calcolo delle distanze, si considerino come riferimento i punti più vicini tra loro tra la bocca di scarico ed il luogo da proteggere.

Se la bocca di scarico dovesse essere posizionata al di sotto dei luoghi da proteggere, per calcolare la distanza minima di separazione, si deve tenere conto dell'entità del flusso di emissione, della sua velocità e della direzione del pennacchio nell'atmosfera. Specifiche di installazione possono essere desunte da linee guida tecniche e dalla legislazione vigente in Spagna (Abad Sanz Isabel et al., 2006; Ministerio de Sanidad y Consumo, 2003)

In ogni caso si dovrà tenere in debita considerazione la direzione dei venti dominanti della zona oggetto dell'installazione.

I materiali costitutivi del circuito idraulico devono resistere all'azione aggressiva dell'acqua, del cloro e di altri disinfettanti, al fine di evitare fenomeni di corrosione.

Si devono evitare materiali porosi e/o assorbenti che facilitano lo sviluppo di batteri e funghi quali cuoio, legno, fibrocemento, cemento, derivati della cellulosa.

Si raccomanda che le parti metalliche del sistema siano sottoposte a trattamento chimico, fisico-chimico o fisico per agevolare la prevenzione delle corrosioni durante il suo esercizio.

L'impianto deve essere facilmente accessibile anche nelle parti interne, onde favorirne l'ispezione e le operazioni di manutenzione ordinaria e straordinaria, pulizia, disinfezione e campionamento.

Le superfici interne della vasca di raccolta devono essere il più possibile lisce, con angoli arrotondati, di facile pulizia e disinfezione.

Il fondo della vasca deve essere realizzato in maniera da evitare il ristagno di acqua e possedere almeno uno scarico, posizionato nel punto più basso, per l'evacuazione del sedimento.

Gli impianti devono disporre dei separatori di goccia ad alta efficienza, che coprano tutta la superficie di scarico, di alta efficienza in modo che le perdite di acqua sotto forma di aerosol siano contenute a meno dello 0,05% della massa d'acqua circolante.

Le Amministrazioni locali o gli Enti delegati devono predisporre e curare la tenuta di un apposito "Catasto" delle torri di raffreddamento ad umido e dei condensatori

evaporativi esistenti, da implementarsi mediante notifica da parte dei responsabili degli impianti di raffreddamento.

5.5. Gestione degli impianti idro-sanitari

Tutti i gestori di strutture sanitarie, di ricovero, recettive, termali, ad uso collettivo ed industriali devono garantire l'attuazione delle seguenti misure di controllo:

a) la temperatura dell'acqua fredda non dovrebbe essere > 20°C. Qualora l'acqua distribuita attraverso la rete idrica superi il suddetto valore si possono creare condizioni per la moltiplicazione di *Legionella* anche in tale rete. Qualora presente, tale criticità e il possibile rimedio devono essere considerati nella valutazione del rischio, applicando adeguate misure di disinfezione;
b) se praticabile, ispezionare periodicamente l'interno dei serbatoi d'acqua fredda: nel caso ci siano depositi o sporcizia, provvedere alla pulizia, e comunque disinfettarli almeno una volta l'anno con 50 mg/L di cloro residuo libero per un'ora. La stessa operazione deve essere effettuata a fronte di lavori che possono aver dato luogo a contaminazioni o a un possibile ingresso di acqua non potabile. Nel caso in cui la disinfezione per iperclorazione non potesse essere applicata, tale mancanza deve essere compensata dall'implementazione di un'attività alternativa, il cui effetto sia valutato almeno altrettanto valido (ad es. disinfezione su base continua da applicarsi sulla tubazione di reintegro al serbatoio);
c) svuotare e disinfettare (se necessario anche disincrostare) i bollitori/serbatoi di accumulo dell'acqua calda sanitaria (compresi i boiler elettrici) almeno due volte all'anno e ripristinarne il funzionamento dopo accurato lavaggio. Nel caso in cui tale sanificazione non potesse essere applicata, tale mancanza deve essere compensata dall'implementazione di un'attività alternativa, il cui effetto sia valutato almeno altrettanto valido;
d) disinfettare l'impianto dell'acqua calda sanitaria con cloro ad elevata concentrazione (cloro residuo libero pari a 50 mg/L per un'ora o 20 mg/L per due ore) o con altri metodi di comprovata efficacia, dopo interventi sugli scambiatori di calore. Nel caso in cui la disinfezione per iperclorazione non potesse essere applicata, tale mancanza deve essere compensata dall'implementazione di un'attività alternativa, il cui effetto sia valutato almeno altrettanto valido;
e) ispezionare mensilmente i serbatoi dell'acqua sanitaria. Accertarsi che tutte le coperture siano intatte e correttamente posizionate;
f) accertarsi che eventuali modifiche apportate all'impianto, oppure nuove installazioni, non creino rami morti o tubazioni con scarsità di flusso dell'acqua o flusso intermittente. Ogniqualvolta si proceda a operazioni di disinfezione, occorre accertarsi che siano oggetto del trattamento anche i rami stagnanti o a ridotto utilizzo, costituiti dalle tubazioni di spurgo o prelievo, le valvole di sovrappressione ed i bypass presenti sugli impianti;
g) ove si riscontri un incremento significativo della crescita microbica che possa costituire un incremento del rischio legionellosi, utilizzare appropriati trattamenti disinfettanti;
h) provvedere, se necessario, a applicare un efficace programma di trattamento dell'acqua, capace di prevenire sia la formazione di biofilm, che potrebbe fungere da luogo ideale per la proliferazione della *Legionella*, sia la corrosione e le incrostazioni che, indirettamente, possono favorire lo sviluppo microbico;

i) ove le caratteristiche dell'impianto lo permettano, l'acqua calda sanitaria deve avere una temperatura d'erogazione costantemente superiore ai 50°C. Per evitare il rischio di ustioni è necessario installare rubinetti dotati di valvola termostatica (TMV). Qualora le caratteristiche dell'impianto o il rischio ustioni non possa essere mitigato con rubinetti dotati di valvola termostatica e quindi la temperatura d'esercizio d'impianto ricada all'interno dell'intervallo di proliferazione della *Legionella* (< 50°C) compensare questo fattore di rischio con l'implementazione di un'attività avente efficacia analoga (es. disinfezione su base continua dell'impianto, incremento degli spurghi dei serbatoi e dei flussaggi delle erogazioni). Motivare tale implementazione nel documento di valutazione del rischio legionellosi;
j) le TMV sono degli elementi a rischio e a volte a valle di esse non è possibile mantenerne il controllo della contaminazione per mezzo del calore o l'aggiunta di biocidi nel sistema dell'acqua calda e fredda. Alcune TMV hanno un meccanismo che rende nella pozione terminale il flussaggio con acqua calda. Dove questo non è possibile dovrà essere limitata la contaminazione attraverso la pulizia, decalcificazione e disinfezione delle TMV e di ogni elemento associato ad esse (es. docce, rubinetti, ecc.);
k) nelle strutture recettive, prima che le camere siano rioccupate, è necessario fare scorrere l'acqua (sia calda che fredda sanitaria) da tutti gli erogatori ivi presenti, per almeno 5 minuti;
l) mantenere le docce, i diffusori delle docce e i rompigetto dei rubinetti puliti e privi di incrostazioni, sostituendoli all'occorrenza, preferendo quelli aperti (es. a stella o croce) rispetto a quelli a reticella e agli aeratori/riduttori di flusso);
m) in tutti gli edifici a funzionamento stagionale, prima della riapertura, procedere ad una pulizia completa dei serbatoi e della rubinetteria ed ad una disinfezione dell'intera rete idrica, facendo anche defluire a lungo l'acqua da tutte le erogazioni da essa servite;
n) nelle strutture abitative condominiali con impianto idro-sanitario centralizzato, l'amministratore di condominio è tenuto ad informare e sensibilizzare i singoli condomini sull'opportunità di adottare le misure di controllo sopraelencate;
o) l'acqua utilizzata nei circuiti di fontane decorative, piscine e vasche per idromassaggi, esposte a scopo dimostrativo, in occasione di fiere o esposizioni, deve essere disinfettata con mezzi fisici e/o chimici.

5.6. Gestione degli impianti aeraulici

Durante l'esercizio degli impianti è importante eseguire:

- ispezioni tecniche per controllarne e rilevarne il corretto funzionamento come riportato dall'Accordo del 7 Febbraio 2013 tra il Governo, le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano sul Documento recante "Procedura operativa per la valutazione e gestione dei rischi correlati all'igiene degli impianti di trattamento aria" e dalle Linee Guida del 5 Ottobre 2006 emesse dalla Presidenza del Consiglio (Conferenza Permanente Stato-Regioni) denominate "Schema di Linee Guida per la definizione di protocolli tecnici di manutenzione predittiva sugli impianti di climatizzazione".
- l'ispezione igienico sanitaria deve verificare le condizioni dell'impianto nel suo insieme, dalla presa d'aria primaria, alle unità di trattamento dell'aria (UTA), ai canali di mandata e di ripresa, fino alle bocchette di immissione in ambiente.
- visite di controllo, con periodicità da definirsi anche in base alla valutazione del rischio, per verificarne le condizioni igienico-sanitarie nel suo complesso.

In particolare i controlli sono da eseguirsi presso le seguenti sezioni dell'impianto considerate più critiche:

Filtri

È da controllare lo stato di efficienza dei filtri (misura della pressione differenziale, tempo di esercizio). Si raccomanda il periodico ricambio dei filtri, nel rispetto delle specifiche fornite dal costruttore.

Batterie di scambio termico

Vanno periodicamente pulite e disinfettate le vasche di raccolta della condensa e le superfici alettate con la rimozione dello sporco organico ed inorganico.

Umidificatori dell'aria ambiente

Deve essere assicurato che non si verifichi formazione di acqua di condensa durante il funzionamento; tutte le parti a contatto con acqua in modo permanente devono essere pulite e, se necessario, periodicamente disinfettate.

Umidificatori adiabatici

La qualità dell'acqua utilizzata nelle sezioni di umidificazione adiabatica deve essere periodicamente controllata. La frequenza di controllo deve essere fornita dalla valutazione del rischio legionellosi. L'incremento della carica batterica deve essere prevenuta mediante sistemi di disinfezione oppure mediante periodica pulizia dei sistemi. La carica batterica totale dell'acqua circolante non deve eccedere il valore standard di 10^6 UFC/L con una temperatura di incubazione di 20°C±1°C e 36°C ±1°C. La presenza di Legionella negli umidificatori è prossima allo 0, se la carica batterica non eccede 10^3 UFC/L.

Sulla base delle evidenze emerse durante l'ispezione igienico sanitaria, qualsiasi fattore che potrebbe comportare un pericolo immediato per la salute umana, dovuto all'inquinamento dell'aria respirata, deve essere eliminato mediante sanificazione dell'impianto.

Sanificazione dell'impianto

Unità di trattamento aria

Tutte le batterie di scambio termico, le vasche di raccolta dell'acqua di condensa, gli umidificatori, i ventilatori, le serrande e le griglie devono essere puliti utilizzando uno o una combinazione dei seguenti metodi:

- ✓ lance ad aria ad alta pressione.
- ✓ sistemi a vapore.
- ✓ apparecchiature ad acqua.
- ✓ aspirazione con aspiratori dotati di filtri HEPA.
- ✓ detergenti non aggressivi.
- ✓ disinfettanti.
- ✓ sistemi manuali.

Le operazioni di pulizia non devono causare alcun danno apprezzabile, né provocare l'erosione o la modifica della disposizione delle alette di passaggio dell'aria.

Sezione filtrante

La sezione filtrante deve essere accuratamente pulita ed ogni residuo o ruggine deve essere rimosso. I filtri devono essere regolarmente sostituiti, nel rispetto delle specifiche fornite dal costruttore.

Umidificatori adiabatici

Sulla base della valutazione del rischio, il circuito della sezione di umidificazione deve essere regolarmente sanificato senza compromettere l'integrità del componente. Qualora necessario, è richiesta anche la disincrostazione e la regolazione degli ugelli nebulizzatori.

Canalizzazioni degli impianti centralizzati

Sulla base della valutazione del rischio, le canalizzazioni devono essere preliminarmente pulite e successivamente disinfettate mediante nebulizzazione, con apparecchiature idonee, del prodotto disinfettante. Tale operazione deve essere eseguita in più punti della distribuzione aeraulica, per consentire il dispensamento del prodotto disinfettante su tutta la superficie delle canalizzazioni.

5.7. Gestione degli impianti di raffreddamento a torri evaporative o a condensatori evaporativi

La qualità dell'acqua utilizzata nelle torri evaporative e nei condensatori evaporativi deve essere controllata attraverso analisi microbiologiche periodiche.

In Tabella 7 sono indicati i tipi di intervento da attuare sulla base della concentrazione di *Legionella* riscontrata in tale tipologia d'impianto.

Si raccomanda di sottoporre a trattamento chimico, o analogo per risultati, l'acqua di raffreddamento, al fine di controllare il rischio che possa essere favorito lo sviluppo microbico a causa della mancanza di un'adeguata copertura biocida.

Il trattamento dell'acqua di raffreddamento deve essere anche finalizzato a ridurre il rischio incrostazioni e corrosioni nell'impianto, la cui influenza indiretta nei confronti del potenziale di proliferazione batterica è significativa.

Tali trattamenti devono costituire parte integrante del processo di valutazione del rischio legionellosi.

Il trattamento biocida su base continua (il cui utilizzo deve essere modulato sulla base del corretto esercizio tecnologico dell'impianto) deve essere supportato mediante interventi di disinfezione routinari, le cui modalità e frequenza devono essere motivati dalla valutazione del rischio legionellosi.

Vanno inoltre attuati interventi, di pulizia e drenaggio del sistema, accompagnati dalla sua disinfezione:

- ✓ prima del collaudo
- ✓ alla fine della stagione di raffreddamento o prima di un lungo periodo di inattività (la cui durata, dipendendo dalla tipologia di struttura presso cui l'impianto è esercitato, deve essere definita dalla valutazione del rischio legionellosi)
- ✓ all'inizio della stagione di raffreddamento o dopo un lungo periodo di inattività (la cui durata, dipendendo dalla tipologia di struttura presso cui l'impianto è esercitato, deve essere definita dalla valutazione del rischio legionellosi)
- ✓ almeno due volte l'anno nel caso di funzionamento continuativo dell'impianto.

Per minimizzare i problemi dovuti alla precipitazione di sali, responsabili di incrostazioni, va previsto il ricambio periodico di parte della massa d'acqua circolante e, qualora necessario, l'addolcimento dell'acqua di reintegro all'impianto.

I separatori di gocce sulle torri di raffreddamento e sui condensatori evaporativi devono essere mantenuti sempre in perfetta efficienza.

5.8. Gestione degli impianti a servizio delle piscine e degli idromassaggi alimentati con acqua dolce

Per quanto riguarda le piscine, la normativa vigente prevede una concentrazione di cloro residuo libero nell'acqua della vasca da 0,7 - 1,5 mg/L.

Sebbene tali valori del cloro rendano improbabile un'eventuale contaminazione da *Legionella*, tuttavia, si raccomanda almeno una volta all'anno la pulizia e la disinfezione shock della vasca, delle tubazioni, la sostituzione dei filtri della vasca, la revisione accurata dei sistemi di circolazione dell'acqua, con eliminazione di ogni deposito.

I filtri dell'acqua, inoltre, devono essere puliti e disinfettati ogni 1-3 mesi.

Le vasche per idromassaggio vanno sottoposte a controllo da parte di personale esperto, che deve provvedere all'effettuazione delle operazioni di pulizia e di corretta conduzione igienica quali:

- Sostituzione giornaliera di almeno metà della massa d'acqua contenuta nell'impianto (solo per vasche ≤ a 10 m^3);
- Mantenimento di una concentrazione di cloro attivo libero nell'acqua della vasca pari a 0.7-1,5 mg/L e del pH tra 7,0-7,6.
- Pulizia e risciacquo giornaliero dei filtri.
- Controllo, almeno tre volte al giorno, della temperatura e della concentrazione del cloro e del pH in impianto.
- Disinfezione accurata dell'impianto almeno una volta a settimana.

5.9. Documentazione degli interventi

I gestori di tutti gli impianti elencati sono tenuti a conservare la documentazione relativa a:

- eventuali modifiche apportate a ciascun impianto a rischio
- interventi di manutenzione ordinari e straordinari, relativi al controllo del rischio, applicati su ciascun impianto a rischio
- operazioni di pulizia e disinfezione applicati su ciascun impianto a rischio.

Tale documentazione deve essere messa a disposizione degli Organi di Controllo, quando richiesto.

5.10. Provvedimenti di emergenza in presenza di cluster

Disattivazioni di impianti.

A scopo preventivo, subito dopo averle ispezionate e provveduto a raccogliere campioni per il controllo analitico, tutte le attrezzature non essenziali identificate come possibili fonte di contagio (ad esempio piscine per idromassaggio, fontane ornamentali, ecc.), devono essere disattivate, fino a che vengano completati gli accertamenti analitici del caso; una volta ultimati gli accertamenti, qualora gli stessi risultino positivi, deve essere effettuata al più presto la disinfezione ambientale, seguita dalla successiva verifica della sua efficacia.

Sospensione dell'attività della struttura interessata.

La decisione se chiudere o meno la struttura, in presenza di un cluster, deve essere presa sulla base della valutazione del rischio, effettuata tenendo conto della tipologia della struttura coinvolta, dell'attuazione da parte del gestore delle misure raccomandate nei paragrafi precedenti, delle caratteristiche degli eventuali altri soggetti esposti, degli esiti ispettivi e, se disponibili, degli esiti analitici.

6. RISCHIO LEGIONELLOSI ASSOCIATO AD ATTIVITÀ PROFESSIONALE

6.1. Introduzione

Dato il numero elevato, non è qui possibile elencare tutte le attività lavorative che possono presentare un rischio di legionellosi: d'altra parte la frequenza di questa patologia nei luoghi di lavoro non può essere facilmente stimata in quanto non sono disponibili statistiche.

Il Decreto Legislativo 9 Aprile 2008, n. 81, le cui disposizioni costituiscono attuazione dell'articolo 1 della Legge del 3 Agosto 2007, n. 123, per il riassetto e la riforma delle norme in materia di Salute e Sicurezza delle lavoratrici e dei lavoratori nei luoghi di lavoro, mediante il riordino e il coordinamento delle medesime in un unico testo normativo, considera il rischio derivante da Legionella, nel suo Titolo X (Esposizione ad agenti biologici).

All'Allegato XLVI sia la *Legionella pneumophila* sia le rimanenti specie di legionelle patogene per l'uomo (*Legionella* spp.) sono classificate quali agente biologico del gruppo 2 ossia, come definito all'articolo 268 (Classificazione degli agenti biologici) "un agente che può causare malattie in soggetti umani e costituire un rischio per i lavoratori; è poco probabile che si propaghi nella comunità; sono di norma disponibili efficaci misure profilattiche o terapeutiche".

Pertanto, sulla base di quanto definito all'Art. 271, il Datore di Lavoro ha l'obbligo di valutare il rischio legionellosi presso ciascun sito di sua responsabilità e, di conseguenza, deve:

- effettuare la valutazione del rischio legionellosi, tenendo conto di tutte le informazioni disponibili sulle caratteristiche dell'agente biologico e sulle modalità lavorative che possano determinarne l'esposizione
- adottare misure protettive e preventive in relazione al rischio valutato
- revisionare la valutazione del rischio legionellosi in occasione di modifiche significative dell'attività lavorativa o degli impianti idrici od aeraulici o qualora siano passati 3 anni dall'ultima redazione (fanno eccezione quelle tipologie di strutture per cui è richiesto un più frequente aggiornamento della valutazione del rischio: strutture sanitarie, termali)
- se la valutazione mette in evidenza un rischio per la salute o la sicurezza dei lavoratori, adottare misure tecniche, organizzative, procedurali ed igieniche idonee, al fine di minimizzare il rischio relativo
- adottare misure specifiche per le strutture sanitarie e veterinarie, per i laboratori e per i processi industriali
- adottare specifiche misure per l'emergenza, in caso di incidenti che possono provocare la dispersione nell'ambiente dell'agente biologico
- adottare misure idonee affinché i lavoratori e/o i loro rappresentanti ricevano una formazione sufficientemente adeguata.

Per l'adozione delle misure protettive, preventive, tecniche, organizzative, procedurali ed igieniche idonee, si deve fare riferimento a quanto definito nelle presenti Linee guida.

6.2. Il rischio per operatori sanitari

La trasmissione della malattia da persona a persona non è mai stata dimostrata. Pertanto per gli operatori sanitari di assistenza, il rischio di contrarre la legionellosi si riduce ai casi in cui avvenga l'inalazione di aerosol contaminato (ad esempio durante operazioni che riguardano

l'igiene personale del paziente con utilizzo di acqua) al quale peraltro sono esposti anche i pazienti.

Tale evento si configura come poco probabile se la struttura sanitaria si è dotata di un programma di controllo del rischio legionellosi correlata all'assistenza ed alla luce del più ridotto grado di suscettibilità all'infezione da parte di individui con sistema immunitario integro (in particolare in assenza di fattori predisponenti).

All'opposto, i tecnici della prevenzione addetti agli interventi di ispezione, controllo e campionamento e, più in generale, gli addetti alla manutenzione degli impianti idrici e aeraulici, capaci di generare aerosol potenzialmente contaminati, devono ritenersi a maggior rischio di esposizione alla *Legionella.*

Le aziende sanitarie, in relazione alla valutazione del rischio (v. Titolo X – D. Lgs 81/2008 e s.m.i.), individueranno tutte le misure di sicurezza di tipo collettivo necessarie da realizzare ed i dispositivi di protezione individuale (DPI) appropriati per tale rischio, da fornire agli operatori preposti alle attività in questione per tutelare la salute di questi soggetti nei confronti del rischio di esposizione a *Legionella* o nei confronti di rischi di natura non microbiologica, come ad esempio ustioni, lesioni da acqua in pressione, ecc.

I Dispositivi di protezione collettiva sono:

- sistemi filtranti da posizionare ai punti terminali o in alternativa agli snodi degli impianti per la produzione di acqua decontaminata da *Legionella*
- sistemi di disinfezione dell'acqua che dimostrino nelle condizioni di impiego una comprovata efficacia (si deve verificare la documentazione tecnico –scientifica che attesti tale efficacia).

Al riguardo tali sistemi devono essere classificati quali dispositivi di protezione collettiva ai sensi del D.Lgs 81/2008 e s.m.i., ne deriva quindi, in base a quanto indicato al Titolo I, Art.15 e Art.18 della suddetta legislazione che la misura di sicurezza scelta debba essere la migliore e la più appropriata per assicurare la protezione dal rischio specifico. Tali dispositivi dovrebbero pertanto essere in possesso di certificazioni di efficacia e di conformità per rispondere ai requisiti legislativi sopra menzionati, tra queste è senz'altro di riconosciuta validità la certificazione CE rilasciata da Organismo Notificato che abbia verificato le caratteristiche tecniche e funzionali di tali sistemi e che attesti il rilascio della menzionata certificazione quale atto di propria responsabilità per la commercializzazione all'interno dei paesi della UE.

I Dispositivi di protezione individuale sono:

- facciali filtranti per la protezione delle vie respiratorie provvisti di certificazione CE di cui al capitolo II della Direttiva 89/686/CE, basata sulla norma europea armonizzata EN 149.
- occhiali di protezione per la protezione da schizzi di liquidi, per i quali sia stata rilasciata da un Organismo Notificato la certificazione CE di Tipo che attesti la qualifica come DPI ai sensi della Direttiva 686/89 in seconda categoria (o terza) e che evidenzi la protezione nei confronti degli schizzi di liquidi o nei confronti di rischi di natura non microbiologica, come ad esempio ustioni, lesioni da acqua in pressione, ecc.
- guanti di protezione, per i quali sia stata rilasciata da un Organismo Notificato la certificazione CE di Tipo che attesti la qualifica come DPI ai sensi della Direttiva 686/89 in terza categoria e che evidenzi la conformità alla EN 374
- tute di protezione, per le quali sia stata rilasciata da un Organismo Notificato la certificazione CE di Tipo che attesti la qualifica come DPI ai sensi della Direttiva 686/89 in terza categoria e la conformità alle norme tecniche di tipo generale e specifico, necessarie a garantire la protezione da agenti biologici e da agenti chimici, quali la EN 14126, la EN 17491–4, la EN 14605, la EN 14325, la EN ISO 13982-1/2 .

Gli operatori devono essere addestrati al corretto utilizzo dei DPI e disporne in quantità e taglia adeguata.

Settore odontoiatrico

La qualità dell'acqua dei riuniti odontoiatrici è di considerevole importanza poiché sia i pazienti che gli operatori sono regolarmente esposti all'acqua ed all'aerosol generato dagli strumenti rotanti. Infatti una delle caratteristiche peculiari dell'acqua che alimenta la poltrona odontoiatrica è quella di combinare la capacità di sviluppare rapidamente il biofilm con quella di generare aerosol potenzialmente contaminato. Il biofilm, prodotto dai batteri che provengono dall'acqua d'alimento, diventa poi una fonte continua per la contaminazione del sistema.
Allo stato attuale, pur essendo stato dimostrato il nesso di causalità tra infezione da legionella e contaminazione del circuito del riunito odontoiatrico (Ricci et al 2012.), non c'è evidenza di una larga diffusione di casi di legionellosi attraverso l'esposizione all'acqua di tali circuiti. Tuttavia è ampiamente dimostrata la presenza di *Legionella* al loro interno (Dutil et al., 2006; Montagna et al., 2006; Pasquarella et al., 2010). Per questo motivo, è importante ai sensi del citato D. Lgs 81/2008 attuare sempre tutte le misure di sicurezza per evitare il rischio di esposizione a potenziali patogeni e creare un ambiente di lavoro sicuro nel quale trattare i pazienti.

Per minimizzare il rischio nel corso di procedure odontoiatriche, vengono di seguito fornite indicazioni di buona pratica da applicare in tale ambito. Per ridurre la contaminazione microbica e/o la formazione del biofilm all'interno dei circuiti idrici del riunito, si raccomanda di:

- eliminare dal circuito i tratti esclusi dalle correnti di flusso
- installare dispositivi antiristagno in grado di far circolare l'acqua in continuo, in particolare durante le pause lavorative
- alimentare il circuito con soluzioni sterili, dopo averlo isolato dalla rete idrica
- disinfettare l'acqua con trattamenti in continuo o discontinui. Questi ultimi, effettuati periodicamente o tra un paziente e il successivo utilizzando disinfettanti di alto livello, evitano la possibilità di contaminazioni chimiche del campo operatorio, riducono l'esposizione degli operatori e minimizzano il rischio di selezionare microrganismi resistenti, ma richiedono maggiore impegno di risorse e attenzione rispetto ai trattamenti in continuo. d

Per ridurre l'esposizione del paziente ad aerosol potenzialmente contaminati e/o minimizzare il rischio nei pazienti più vulnerabili si consiglia di:

- flussare ciascuno strumento accendendolo a vuoto, all'inizio di ogni giornata lavorativa (tempo minimo 2 minuti) e prima di ogni intervento (tempo minimo 20-30 sec.) (CDC, 2003)
- installare, subito a monte dei manipoli, filtri ($\leq$ 0,2 μm) in grado di trattenere i microrganismi provenienti dall'interno del circuito
- acquisire, preliminarmente all'inizio delle cure, informazioni sulla salute del paziente, con particolare riguardo alle condizioni che definiscono il "rischio molto elevato" (Tabella 9). In questo caso dovrebbero essere adottate rigorosamente le misure sopra illustrate, volte a contenere il rischio di contaminazione da *Legionella*.

In considerazione dei dati di letteratura che dimostrano un'ampia contaminazione da *Legionella* dei circuiti dei riuniti odontoiatrici, la ricerca del microorganismo è raccomandata almeno una volta all'anno qualora le misure di minimizzazione del rischio sopra elencate non vengano messe in atto e ogni volta che si verifica un caso di malattia. Ogni studio odontoiatrico deve inoltre tenere un registro degli interventi effettuati.

A tutela della salute del paziente, si sottolinea, infine, che per le procedure chirurgiche invasive devono essere utilizzate esclusivamente soluzioni sterili in circuiti di distribuzione a

loro volta sterili. Nel caso in cui non vi fosse la garanzia di ottenere il requisito di sterilità per i circuiti propri del riunito, andrebbe realizzato un sistema di bypass utilizzando dispositivi sterili monouso o sterilizzabili.

Il rischio per altre categorie di lavoratori

In letteratura sono riportati casi di legionellosi verificatisi tra lavoratori delle seguenti categorie:

- ✓ Vigili del fuoco e altri operatori del soccorso pubblico e della difesa civile;
- ✓ Movimentatori di terra, minatori;
- ✓ Lavoratori dell'industria automobilistica;
- ✓ Personale addetto alle operazioni di manutenzione/pulizia delle torri evaporative (Buehler et al., 1985) e degli impianti di distribuzione /trattamento acqua sanitaria;
- ✓ Addetti alle piattaforme di trivellazione (Pastoris et al., 1987);
- ✓ Addetti agli impianti di depurazione;
- ✓ Addetti alla pulizia di turbine nel settore industriale;
- ✓ Giardinieri (Den Boer et al., 2007; Patten et al., 2010; Stojek and Dutkiewicz, 2002);
- ✓ Personale addetto alla vendita/manutenzione di vasche per idromassaggio;
- ✓ Operatori ecologici durante la pulizia delle strade con acqua a pressione;
- ✓ Lavoratori delle cave di marmo (durante le operazioni di taglio del marmo con acqua);
- ✓ Addetti alla pulizia negli autolavaggi;

Anche sulla base di questa considerazione ciascun Datore di lavoro, secondo quanto previsto dal D. Lgs 81/2008 e successive modifiche ha l'obbligo di considerare che il rischio di legionellosi può riguardare sia i propri lavoratori che coloro che frequentano ciascun sito di sua responsabilità e pertanto si ribadisce l'obbligo di effettuare una valutazione del rischio (revisionandola almeno ogni 3 anni, salvo disposizioni più restrittive), così da mettere in atto tutte le misure di prevenzione e controllo descritte nei paragrafi precedenti, non solamente in risposta ad un caso di legionellosi, ma prima che questo si verifichi, quale prevenzione del rischio.

BIBLIOGRAFIA

Abad Sanz Isabel, Antonio Avello de Miguel, Mª Teresa López González, Javier Reinares Ortiz de Villajos, and Concepción de Paz Collantes. Manual para la prevención de la legionelosis en instalaciones de riesgo. Comunidad de Madrid. 2006.

ACHD. Approches to prevention and control of Legionella infection in Allegheny County health care facilities. Allegheny County Health Department. 1997.

AFNOR NF T90-471 Avril 2010 Qualité de l'eau - Détection et quantification des Legionella et/ou Legionella pneumophila par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT – PCR)

Alary,M. and Joly,J.R.: 1992, 'Factors contributing to the contamination of hospital water distribution systems by legionellae', *J. Infect. Dis.***165,** 565-569.

Alleron,L., Merlet,N., Lacombe,C. and Frere,J.: 2008, 'Long-term survival of Legionella pneumophila in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment', *Curr. Microbiol.***57,** 497-502.

Al-Marzooq F, Imad MA, How SH, Kuan YC .: 2011, Development of multiplex real-time PCR for the rapid detection of five bacterial causes of community acquired pneumonia. Trop Biomed;28(3):545-56.

American Thoracic Society: 2005,*Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia,* 388-416pp.

Aoki,S., Hirakata,Y., Miyazaki,Y., Izumikawa,K., Yanagihara,K., Tomono,K., Yamada,Y., Tashiro,T., Kohno,S. and Kamihira,S.: 2003, 'Detection of Legionella DNA by PCR of whole-blood samples in a mouse model', *J. Med. Microbiol.***52,** 325-329.

Approved Code of Practice and guidance (ACoP). Legionnaires' Disease: The Control of *Legionella* Bacteria in Water Systems. 2000.

AWT T C o. Legionella 2003: update and AWT statement. Association of Water Technologies. 2003.

Bailleul,E., Magerman,K., Mewis,A., Peeters,V., Rummens,J.L. and Cartuyvels,R.: 2004, 'False-positive result with BinaxNOW Legionella Antigen immunochromatographic (ICT) assay: response to Helbig et al. (2001)', *J. Med. Microbiol.***53,** 173.

Behets,J., Declerck,P., Delaedt,Y., Creemers,B. and Ollevier,F.: 2007, 'Development and evaluation of a Taqman duplex real-time PCR quantification method for reliable enumeration of Legionella pneumophila in water samples', *J. Microbiol. Methods.***68,** 137-144.

Benson,R.F., Tang,P.W. and Fields,B.S.: 2000, 'Evaluation of the Binax and Biotest urinary antigen kits for detection of Legionnaires' disease due to multiple serogroups and species of Legionella', *J. Clin. Microbiol.***38,** 2763-2765.

Benitez AJ, Winchell JM.: 2013, Clinical application of a multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Legionella*species, *Legionella pneumophila*, and *Legionella pneumophila* serogroup 1.J ClinMicrobiol. ;51(1):348-51. doi: 10.1128/JCM.02510-12

Blazquez Garrido,R.M., Espinosa Parra,F.J., Alemany,F.L., Ramos Guevara,R.M., Sanchez-Nieto,J.M., Segovia,H.M., Serrano Martinez,J.A. and Huerta,F.H.: 2005, 'Antimicrobial chemotherapy for Legionnaires disease: levofloxacin versus macrolides', *Clin. Infect. Dis.***40,** 800-806.

Bonetta,S., Bonetta,S., Ferretti,E., Balocco,F. and Carraro,E.: 2010, 'Evaluation of Legionella pneumophila contamination in Italian hotel water systems by quantitative real-time PCR and culture methods', *J. Appl. Microbiol.***108,** 1576-1583.

Borella P, Montagna MT, Stampi S, Stancanelli G, Romano-Spica V, Triassi M, Marchesi I, Bargellini A, Tatò D, Napoli C, Zanetti F, Leoni E, Moro M, Scaltriti S, Ribera D'Alcalà G, Santarpia R, Boccia S. 2005, Legionella contamination in hot water of Italian hotels. *Appl Environ Microbiol.* **71**, 5805-13.

Bornstein,N., Marmet,D., Surgot,M., Nowicki,M., Arslan,A., Esteve,J. and Fleurette,J.: 1989, 'Exposure to Legionellaceae at a hot spring spa: a prospective clinical and serological study', *Epidemiol. Infect.***102,** 31-36.

Boswell,T.C.: 1996, 'Serological cross reaction between legionella and campylobacter in the rapid microagglutination test', *J. Clin. Pathol.***49,** 584-586.

Brabender,W., Hinthorn,D.R., Asher,M., Lindsey,N.J. and Liu,C.: 1983, 'Legionella pneumophila wound infection', *JAMA.***250,** 3091-3092.

Buchbinder,S., Trebesius,K. and Heesemann,J.: 2002, 'Evaluation of detection of Legionella spp. in water samples by fluorescence in situ hybridization, PCR amplification and bacterial culture', *Int. J. Med. Microbiol.***292,** 241-245.

Buehler,J.W., Kuritsky,J.N., Gorman,G.W., Hightower,A.W., Broome,C.V. and Sikes,R.K.: 1985, 'Prevalence of antibodies to Legionella pneumophila among workers exposed to a contaminated cooling tower', *Arch. Environ. Health.***40,** 207-210.

Burnsed,L.J., Hicks,L.A., Smithee,L.M., Fields,B.S., Bradley,K.K., Pascoe,N., Richards,S.M., Mallonee,S., Littrell,L., Benson,R.F. and Moore,M.R.: 2007, 'A large, travel-associated outbreak of legionellosis among hotel guests: utility of the urine antigen assay in confirming Pontiac fever', *Clin. Infect. Dis.***44,** 222-228.

Cameron,S., Roder,D., Walker,C. and Feldheim,J.: 1991, 'Epidemiological characteristics of Legionella infection in South Australia: implications for disease control', *Aust. N Z. J. Med.***21,** 65-70.

Castellani,P.M., Lo,M.R., Goldoni,P., Mentore,B., Balestra,G., Ciceroni,L. and Visca,P.: 1999, 'Legionnaires' disease on a cruise ship linked to the water supply system: clinical and public health implications', *Clin. Infect. Dis.***28,** 33-38.

Castellani Pastoris, M., Ciceroni, L., Lo Monaco, R., Goldoni, P., Mentore, B., Flego, G., Cattani, L., Ciarrocchi, S., Pinto, A., Visca, P.:1997, Molecular epidemiology of an outbreak of Legionnaires' disease associated with a cooling tower in Genova-Sestri Ponente, Italy.Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Dec;16(12):883-92.

Coetzee N, Duggal H, Hawker J, Ibbotson S, Harrison TG, Phin N, Laza-Stanca V, Johnston R, Iqbal Z, Rehman Y, Knapper E, Robinson S, Aigbogun N.
An outbreak of Legionnaires' disease associated with a display **spa pool** in retail premises, Stoke-on-Trent, United Kingdom, July 2012.
Euro Surveill. 2012 Sep 13;17(37). doi:pii: 20271.

CDC: 2003, *Guidelines for Infection Control in Dental Health-Care Settings, 2003.*, MMWR.

Cloud,J.L., Carroll,K.C., Pixton,P., Erali,M. and Hillyard,D.R.: 2000, 'Detection of Legionella species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation', *J. Clin. Microbiol.***38,** 1709-1712.

Cosentini,R., Tarsia,P., Blasi,F., Roma,E. and Allegra,L.: 2001, 'Community-acquired pneumonia: role of atypical organisms', *Monaldi Arch. Chest Dis.***56,** 527-534.

Costa,J., da Costa,M.S. and Verissimo,A.: 2010, 'Colonization of a therapeutic spa with Legionella spp: a public health issue', *Res. Microbiol.***161,** 18-25.

Declerck,P., Behets,J., van,H., V and Ollevier,F.: 2007, 'Detection of Legionella spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments', *Water Res.***41,** 3159-3167.

Deforges,L., Legrand,P., Tankovic,J., Brun-Buisson,C., Lang,P. and Soussy,C.J.: 1999, 'Case of false-positive results of the urinary antigen test for Legionella pneumophila', *Clin. Infect. Dis.***29,** 953-954.

Den Boer,J.W., Yzerman,E.P., Jansen,R., Bruin,J.P., Verhoef,L.P., Neve,G. and van der Zwaluw,K.: 2007, 'Legionnaires' disease and gardening', *Clin. Microbiol. Infect.***13,** 88-91.

Diederen,B.M., de Jong,C.M., Marmouk,F., Kluytmans,J.A., Peeters,M.F. and Van der Zee,A.: 2007, 'Evaluation of real-time PCR for the early detection of Legionella pneumophila DNA in serum samples', *J. Med. Microbiol.***56,** 94-101.

Ditommaso,S., Gentile,M., Giacomuzzi,M. and Zotti,C.M.: 2011, 'Recovery of Legionella species from water samples using an internal method based on ISO 11731: suggestions for revision and implementation', *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.***70,** 200-206.

Dutil,S., Tessier,S., Veillette,M., Laflamme,C., Meriaux,A., Leduc,A., Barbeau,J. and Duchaine,C.: 2006, 'Detection of Legionella spp. by fluorescent in situ hybridization in dental unit waterlines', *J. Appl. Microbiol.***100,** 955-963.

Edelstein, PH.: 1982, Comparative Study of Selective Media for Isolation of Legionella pneumophila from Potable Water - Journal of Clinical Microbiology, p. 697-699

Edelstein,P.H. and Cianciotto,N.P.: 2005, '*Legionella*.', in G.L.Mandell, Bennett JE and E.L.Domingue (eds.), *Principles and Practice of Infectious Disease 6th Ed*, Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, pp. 2711-12730.

Edelstein,P.H.: 1993, 'Legionnaires' disease', *Clin. Infect. Dis.***16,** 741-747.

Edelstein,P.: 2002, 'Detection of antibodies to *Legionella* spp', in Rose NR et al (ed.), *Manual of clinical laboratory immunology 16th Ed*, ASM Press, Washington DC, pp. 476-486.

EPA. Legionella: drinking water health advisory. Allegheny County Health Department. 2001.

Erdogan,H. and Arslan,H.: 2007, 'Colonization of Legionella species in hotel water systems in Turkey', *J. Travel. Med.***14,** 369-373.

European guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires'Diseas: 2004.

EWGLINet and EWGLI. European guidelines for control and prevention of travel associated legionnaires' disease. The European Working Group for Legionella Infections. 2005.

Fields,B.S., Benson,R.F. and Besser,R.E.: 2002, 'Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation', *Clin. Microbiol. Rev.***15,** 506-526.

Fine,M.J., Auble,T.E., Yealy,D.M., Hanusa,B.H., Weissfeld,L.A., Singer,D.E., Coley,C.M., Marrie,T.J. and Kapoor,W.N.: 1997, 'A prediction rule to identify low-risk patients with community-acquired pneumonia', *N Engl. J. Med.***336,** 243-250.

Fliermans,C.B., Cherry,W.B., Orrison,L.H., Smith,S.J., Tison,D.L. and Pope,D.H.: 1981, 'Ecological distribution of Legionella pneumophila', *Appl. Environ. Microbiol.***41,** 9-16.

Fontana, S., Scaturro M., Rota, M.C., Caporali, M.G., Ricci, M.L..2014 Molecular typing of Legionella pneumophila serogroup 1 clinical strains isolated in Italy.Int J Med Microbiol. 2014 Jul;304(5-6):597-602.

Formica,N., Yates,M., Beers,M., Carnie,J., Hogg,G., Ryan,N. and Tallis,G.: 2001, 'The impact of diagnosis by legionella urinary antigen test on the epidemiology and outcomes of Legionnaires' disease', *Epidemiol. Infect.***127,** 275-280.

Fraser,D.W., Tsai,T.R., Orenstein,W., Parkin,W.E., Beecham,H.J., Sharrar,R.G., Harris,J., Mallison,G.F., Martin,S.M., McDade,J.E., Shepard,C.C. and Brachman,P.S.: 1977, 'Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia', *N. Engl. J. Med.***297,** 1189-1197.

Fry,N.K., Afshar,B., Bellamy,W., Underwood,A.P., Ratcliff,R.M. and Harrison,T.G.: 2007, 'Identification of Legionella spp. by 19 European reference laboratories: results of the European

Working Group for Legionella Infections External Quality Assessment Scheme using DNA sequencing of the macrophage infectivity potentiator gene and dedicated online tools', *Clin. Microbiol. Infect.***13,** 1119-1124.

Gilbert,D.N., Moellering,R.C., Eliopoulos,G.M. and Sande,M.A.: 2008, *The Sanford guide to antimicrobial therapy*, Sanford Guide. Ed. 37th .

Guidelines for Preventing Health-Care-Associated Pneumonia: 2004, *Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committe*, MMWR.

Hackman,B.A., Plouffe,J.F., Benson,R.F., Fields,B.S. and Breiman,R.F.: 1996, 'Comparison of Binax Legionella Urinary Antigen EIA kit with Binax RIA Urinary Antigen kit for detection of Legionella pneumophila serogroup 1 antigen', *J. Clin. Microbiol.***34,** 1579-1580.

Health D o. Controlling Legionella in warm water systems 2010. Victorian Government Department of Health, Melbourne, Victoria (AU). 2010.

Helbig,J.H., Luck,P.C., Kunz,B. and Bubert,A.: 2006, 'Evaluation of the Duopath Legionella lateral flow assay for identification of Legionella pneumophila and Legionella species culture isolates', *Appl. Environ. Microbiol.***72,** 4489-4491.

Helbig,J.H., Uldum,S.A., Bernander,S., Luck,P.C., Wewalka,G., Abraham,B., Gaia,V. and Harrison,T.G.: 2003, 'Clinical utility of urinary antigen detection for diagnosis of community-acquired, travel-associated, and nosocomial legionnaires' disease', *J. Clin. Microbiol.***41,** 838-840.

Helbig,J.H., Uldum,S.A., Luck,P.C. and Harrison,T.G.: 2001, 'Detection of Legionella pneumophila antigen in urine samples by the BinaxNOW immunochromatographic assay and comparison with both Binax Legionella Urinary Enzyme Immunoassay (EIA) and Biotest Legionella Urin Antigen EIA', *J. Med. Microbiol.***50,** 509-516.

Horwitz,M.A.: 1983, 'The Legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes', *J. Exp. Med.***158,** 2108-2126.

HPA & HSE 2006 *Management of Spa Pools: Controlling the Risk of Infection.*London: HealthProtection Agency. 2006 ISBN 0 901144 80 0.

HSC. The control of legionella bacteria in water systems. Approved code of practice & guidance. Health & Safety Executive Books. 2000.

Joly,P., Falconnet,P.A., Andre,J., Weill,N., Reyrolle,M., Vandenesch,F., Maurin,M., Etienne,J. and Jarraud,S.: 2006a, 'Quantitative real-time Legionella PCR for environmental water samples: data interpretation', *Appl. Environ. Microbiol.***72,** 2801-2808.

Joly,P., Falconnet,P.A., Andre,J., Weill,N., Reyrolle,M., Vandenesch,F., Maurin,M., Etienne,J. and Jarraud,S.: 2006b, 'Quantitative real-time Legionella PCR for environmental water samples: data interpretation', *Appl. Environ. Microbiol.***72,** 2801-2808.

Joseph,C.A. and Ricketts,K.D.: 2010, 'Legionnaires disease in Europe 2007-2008', *Euro. Surveill.***15,** 19493.

Kazandjian,D., Chiew,R. and Gilbert,G.L.: 1997, 'Rapid diagnosis of Legionella pneumophila serogroup 1 infection with the Binax enzyme immunoassay urinary antigen test', *J. Clin. Microbiol.***35,** 954-956.

Kohler,R.B., Winn,W.C., Jr. and Wheat,L.J.: 1984, 'Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires disease', *J. Clin. Microbiol.***20,** 605-607.

Kura,F., Amemura-Maekawa,J., Yagita,K., Endo,T., Ikeno,M., Tsuji,H., Taguchi,M., Kobayashi,K., Ishii,E. and Watanabe,H.: 2006, 'Outbreak of Legionnaires' disease on a cruise ship linked to spa-bath filter stones contaminated with Legionella pneumophila serogroup 5', *Epidemiol. Infect.***134,** 385-391.

Lee,J.V., Lai,S., Exner,M., Lenz,J., Gaia,V., Casati,S., Hartemann,P., Luck,C., Pangon,B., Ricci,M.L., Scaturro,M., Fontana,S., Sabria,M., Sanchez,I., Assaf,S. and Surman-Lee,S.: 2011, 'An international trial of quantitative PCR for monitoring Legionella in artificial water systems', *J. Appl. Microbiol.*

Legionella and the prevention of legionellosis WHO: 2007.

Leoni,E., Legnani,PP.: 2001,Comparison of selective procedures for isolation and enumeration of Legionella species from hot water systems - Journal of Applied Microbiology, 2001, p. 90, 27-33Levi,K., Smedley,J. and Towner,K.J.: 2003, 'Evaluation of a real-time PCR hybridization assay for rapid detection of Legionella pneumophila in hospital and environmental water samples', *Clin. Microbiol. Infect.***9,** 754-758.

Lowry,P.W., Blankenship,R.J., Gridley,W., Troup,N.J. and Tompkins,L.S.: 1991, 'A cluster of legionella sternal-wound infections due to postoperative topical exposure to contaminated tap water', *N Engl. J. Med.***324,** 109-113.

Lowry,P.W. and Tompkins,L.S.: 1993, 'Nosocomial legionellosis: a review of pulmonary and extrapulmonary syndromes', *Am. J. Infect. Control.***21,** 21-27.

Luck,P.C., Helbig,J.H. and Shuppler,M.: 2002, 'Epidemiology and laboratory diagnosis of Legionella infections', *Journal of Laboratory Medicine.* 174-182.

Mandell,L.A., Wunderink,R.G., Anzueto,A., Bartlett,J.G., Campbell,G.D., Dean,N.C., Dowell,S.F., File,T.M., Jr., Musher,D.M., Niederman,M.S., Torres,A. and Whitney,C.G.: 2007, 'Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults', *Clin. Infect. Dis.***44 Suppl 2,** S27-S72.

Marshall,L.E., Boswell,T.C. and Kudesia,G.: 1994, 'False positive legionella serology in campylobacter infection: campylobacter serotypes, duration of antibody response and elimination of cross-reactions in the indirect fluorescent antibody test', *Epidemiol. Infect.***112,** 347-357.

Martinelli,F., Carasi,S., Scarcella,C. and Speziani,F.: 2001, 'Detection of Legionella pneumophila at thermal spas', *New Microbiol.***24,** 259-264.

McDade,J.E., Brenner,D.J. and Bozeman,F.M.: 1979, 'Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947', *Ann. Intern. Med.***90,** 659-661.

McDonough,E.A., Barrozo,C.P., Russell,K.L. and Metzgar,D.: 2005, 'A multiplex PCR for detection of Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumoniae, Legionella pneumophila, and Bordetella pertussis in clinical specimens', *Mol. Cell Probes.***19,** 314-322.

Merault N, Rusniok C, Jarraud S, Gomez-Valero L, Cazalet C, MarinM, Brachet E, Aegerter P, Gaillard JL, Etienne J, Herrmann JL, LawrenceC, Buchrieser C.: 2011, Specific real-time PCR for simultaneous detection and identification of *Legionella pneumophila* serogroup 1 in water and clinical samples. Appl. Environ. Microbiol. 77:1708 –1717.

Ministerio de Sanidad y Consumo. Real Decreto del Ministerio de Sanidad y Consumo por el que se establecen los criterios higiénico-sanitarios para la prevención y control de la legionelosis. Real Decreto 865/2003 . 2003.

Montagna,M.T., Tato,D., Napoli,C., Castiglia,P., Guidetti,L., Liguori,G., Petti,S. and Tanzi,M.L.: 2006, 'Pilot study on the presence of *Legionella spp* in 6 Italian cities' dental units', *Ann. Ig.***18,** 297-303.

Morio,F., Corvec,S., Caroff,N., Le,G.F., Drugeon,H. and Reynaud,A.: 2008, 'Real-time PCR assay for the detection and quantification of Legionella pneumophila in environmental water samples: utility for daily practice', *Int. J. Hyg. Environ. Health.***211,** 403-411.

Mouchtouri,V., Velonakis,E., Tsakalof,A., Kapoula,C., Goutziana,G., Vatopoulos,A., Kremastinou,J. and Hadjichristodoulou,C.: 2007, 'Risk factors for contamination of hotel water distribution systems by Legionella species', *Appl. Environ. Microbiol.***73,** 1489-1492.

Muder R.R.: 2000, 'Other Legionella species', in G.L.Mandell, J.E.Bennett and R.Dolin (eds.), *Principles and practice of infectious diseases,* Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, pp. 2435-2441.

Murdoch,D.R.: 2003, 'Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pneumonia', *Clin. Infect. Dis.***36,** 1162-1170.

Mykietiuk,A., Carratala,J., Fernandez-Sabe,N., Dorca,J., Verdaguer,R., Manresa,F. and Gudiol,F.: 2005, 'Clinical outcomes for hospitalized patients with Legionella pneumonia in the antigenuria era: the influence of levofloxacin therapy', *Clin. Infect. Dis.***40,** 794-799.

Napoli,C., Fasano,F., Iatta,R., Barbuti,G., Cuna,T. and Montagna,M.T.: 2010, 'Legionella spp. and legionellosis in southeastern Italy: disease epidemiology and environmental surveillance in community and health care facilities', *BMC Public Health.***10,** 660.

Nomanpour B, Ghodousi A, Babaei T, Jafari S, Feizabadi MM.:2012; Single tube real time **PCR** for detection of *Streptococcus pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumoniae* and *Legionella pneumophila* from clinical samples of CAP. *Acta Microbiol Immunol Hung*. ;59(2):171-84**.**

Okada,C., Kura,F., Wada,A., Inagawa,H., Lee,G.H. and Matsushita,H.: 2002, 'Cross-reactivity and sensitivity of two Legionella urinary antigen kits, Biotest EIA and Binax NOW, to extracted antigens from various serogroups of L. pneumophila and other Legionella species', *Microbiol. Immunol.***46,** 51-54.

Olsen,C.W., Elverdal,P., Jorgensen,C.S. and Uldum,S.A.: 2009, 'Comparison of the sensitivity of the Legionella urinary antigen EIA kits from Binax and Biotest with urine from patients with infections caused by less common serogroups and subgroups of Legionella', *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.***28,** 817-820.

Pasquarella,C., Veronesi,L., Castiglia,P., Liguori,G., Montagna,M.T., Napoli,C., Rizzetto,R., Torre,I., Masia,M.D., Di,O., V, Colucci,M.E., Tinteri,C. and Tanzi,M.: 2010, 'Italian multicentre study on microbial environmental contamination in dental clinics: a pilot study', *Sci. Total Environ.***408,** 4045-4051.

Pastoris,M.C., Greco,D., Cacciottolo,J.M., Vassallo,A., Grech,A. and Bartlett,C.L.: 1987, 'Legionnaires' disease on an oil drilling platform in the Mediterranean: a case report', *Br. J. Ind. Med.***44,** 645-646.

Patten,S.M., Sur,E., Sundaram,R. and Weinhardt,B.: 2010, 'Dangers in the garden', *Lancet.***376,** 844.

Pedro-Botet,L. and Yu,V.L.: 2006, 'Legionella: macrolides or quinolones?', *Clin. Microbiol. Infect.***12 Suppl 3,** 25-30.

Ratcliff,R.M., Lanser,J.A., Manning,P.A. and Heuzenroeder,M.W.: 1998, 'Sequence-based classification scheme for the genus Legionella targeting the mip gene', *J. Clin. Microbiol.***36,** 1560-1567.

Reinthaler at al.:1993, Comparative study of procedures for isolation and cultivation of Legionella pneumophila from tap water in hospitals – *Journal of Clinical Microbiology,* p. 1213-1216

Ricci, M. L., Fontana S., Pinci F., Fiumana E., Pedna M.F., Farolfi P., Bucci Sabattini M.A., Scaturro M.: 2012, A dental unit waterline as source of a fatal pneumonia. *The Lancet*18;379(9816):684.

Rogers,J., Dowsett,A.B., Dennis,P.J., Lee,J.V. and Keevil,C.W.: 1994, 'Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of Legionella pneumophila in a model potable water system containing complex microbial flora', *Appl. Environ. Microbiol.***60,** 1585-1592.

Rose NR et al: 2002, *Manual of clinical laboratory immunology 16th Ed*, ASM Press, Washington DC, 1282pp.

Rota,M.C., Pontrelli, G., Scaturro, M., Bella, A., Bellomo, A.R., Trinito, M.O., Salmaso, S., Ricci, M.L.:2005Legionnaires' disease outbreak in Rome, Italy.Epidemiol Infect. Oct;133(5):853-9.

Rota, M.C., Scaturro, M., Fontana, S., Foroni, M., Boschetto, G., Trentin, L., Blengio, G., Bandettini, G., Buratto, T., Caporali, M., Napoli, C., Ricci M.L.:2011Cluster of travel-associated Legionnaires disease in Lazise, Italy, July to August 2011.Euro Surveill. Oct 6;16(40). pii: 19982.

Rota, M.C., Caporali, M.G., Bella, A., Ricci, M.L., Napoli, C.: 2013, Legionnaires' disease in Italy: results of the epidemiological surveillance from 2000 to 2011.Euro Surveill. Jun 6;18(23).

Rota M.C., Caporali M.G., Napoli C., Bella A., Giannitelli S., Mandarino G., Scaturro M., Fontana, S.Ricci M.L. Rapporto annuale sulla legionellosi in Italia nel 2013. *Not Ist Super di Sanità* 2014; 27 (10) 3-9.

Rota MC, Fontana S, Montaño-Remacha C, Scaturro M, Caporali MG, Vullo V, Scorzolini L, Ercole A, Ricci ML. Legionnaires' disease pseudoepidemic due to falsely-positive urine antigen tests. J Clin Microbiol. 2014 Apr 9.

Sabria,M., Pedro-Botet,M.L., Gomez,J., Roig,J., Vilaseca,B., Sopena,N. and Banos,V.: 2005, 'Fluoroquinolones vs macrolides in the treatment of Legionnaires disease', *Chest.***128,** 1401-1405.

Scaturro,M., Dell'eva,I., Helfer,F. and Ricci,M.L.: 2007, 'Persistence of the same strain of Legionella pneumophila in the water system of an Italian hospital for 15 years', *Infect. Control Hosp. Epidemiol.***28,** 1089-1092.

Scaturro, M., Fontana, S., Crippa, S., Caporali, M.G., Seyler, T., Veschetti, E., Villa, G., Rota, M.C., Ricci, M.L.: 2014 An unusually long-lasting outbreak of community-acquired Legionnaires' disease, 2005-2008, Italy. Epidemiol Infect. Nov 27:1-10.

Shih,H.Y. and Lin,Y.E.: 2006, 'Caution on interpretation of legionella results obtained using real-time PCR for environmental water samples', *Appl. Environ. Microbiol.***72,** 6859.

Singh,N., Stout,J.E. and Yu,V.L.: 2004, 'Prevention of Legionnaires' disease in transplant recipients: recommendations for a standardized approach', *Transpl. Infect. Dis.***6,** 58-62.

Stojek,N.M. and Dutkiewicz,J.: 2002, 'Legionella in sprinkling water as a potential occupational risk factor for gardeners', *Ann. Agric. Environ. Med.***9,** 261-264.

Stout,J.E., Rihs,J.D. and Yu,V.L.: 2003, 'Legionella', in P.R.Murray (ed.), *Manual of clinical microbiology 8th Ed*, ASM Press, Washington DC, pp. 809-823.

Stout,J.E. and Yu,V.L.: 2003, 'Experiences of the first 16 hospitals using copper-silver ionization for Legionella control: implications for the evaluation of other disinfection modalities', *Infect. Control Hosp. Epidemiol.***24,** 563-568.

Surman-Lee S, Drasar V &Lee J. V**.,** 2007 Natural spas, hot tubs and swimming pools. Chapter 8 in *Legionella and the Prevention of Legionellosis*. WHO ISBN 92 4 156297 8, pp119 – 136

Svarrer,C.W., Lueck,C.P., Elverdal,P.L. and Uldum,S.A.: 2012, 'The immunochromatic kits Xpect(R) Legionella and BinaxNOW(R) Legionella for detection of *Legionella pneumophila* urinary antigen have low sensitivities for the diagnosis of Legionnaires' disease', *J. Med. Microbiol.*

Templeton,K.E., Scheltinga,S.A., Sillekens,P., Crielaard,J.W., van Dam,A.P., Goossens,H. and Claas,E.C.: 2003, 'Development and clinical evaluation of an internally controlled, single-tube multiplex real-time PCR assay for detection of Legionella pneumophila and other Legionella species', *J. Clin. Microbiol.***41,** 4016-4021.

Yamamoto,H., Hashimoto,Y. and Ezaki,T.: 1993, 'Comparison of detection methods for Legionella species in environmental water by colony isolation, fluorescent antibody staining, and polymerase chain reaction', *Microbiol. Immunol.***37,** 617-622.

Yaradou,D.F., Hallier-Soulier,S., Moreau,S., Poty,F., Hillion,Y., Reyrolle,M., Andre,J., Festoc,G., Delabre,K., Vandenesch,F., Etienne,J. and Jarraud,S.: 2007, 'Integrated real-time PCR for detection and monitoring of Legionella pneumophila in water systems', *Appl. Environ. Microbiol.***73,** 1452-1456.

Yu,P.Y., Lin,Y.E., Lin,W.R., Shih,H.Y., Chuang,Y.C., Ben,R.J., Huang,W.K., Chen,Y.S., Liu,Y.C., Chang,F.Y., Yen,M.Y., Liu,C.C., Ko,W.C., Lin,H.H. and Shi,Z.Y.: 2008, 'The high prevalence of Legionella pneumophila contamination in hospital potable water systems in Taiwan: implications for hospital infection control in Asia', *Int. J. Infect. Dis.***12,** 416-420.

Yu,V.L.: 1998, 'Resolving the controversy on environmental cultures for Legionella: a modest proposal', *Infect. Control Hosp. Epidemiol.***19,** 893-897.

Yu,V.L., Greenberg,R.N., Zadeikis,N., Stout,J.E., Khashab,M.M., Olson,W.H. and Tennenberg,A.M.: 2004, 'Levofloxacin efficacy in the treatment of community-acquired legionellosis', *Chest.***125,** 2135-2139.

Yzerman,E.P., Den Boer,J.W., Lettinga,K.D., Schellekens,J., Dankert,J. and Peeters,M.: 2002, 'Sensitivity of three urinary antigen tests associated with clinical severity in a large outbreak of Legionnaires' disease in The Netherlands', *J. Clin. Microbiol.***40,** 3232-3236.

ALLEGATO 1:SPECIE E SIEROGRUPPI DI LEGIONELLA

***Legionella* species**	**Siero gruppi**	**Associazione con casi clinici**	**Riferimenti bibliografici**
1. ***L. adelaidensis***		Non noto	Benson et al., 1991;
2. ***L. anisa***		Si	Gorman *etal*. 1985
3. L. beliardensis		Non noto	Lo Presti et al., 2000
4. L. birminghamensis		Si	Wilkinson et al., 1988;
5. L. bozemanii	2	Si	Brenner DJ et al, 1980;Tang W.P. et al ,1984;
6. L. brunenti		Non noto	Wilkinson et al., 1988
7. L. busanensis		Non noto	Park et al., 2003
8. L. cardiaca		Si	Pearce et al. ,2012
9. L. cherrii		Non noto	Brenner et al., 1985;
10. L. cincinnatiensis		Si	Thacker *etal*. 1988,
11. L. drancourtii		Non noto	La Scola et al., 2004
12. L.dresdenensis		Non noto	Lück*etal*. 2010, sp. nov
13. L. drozanskii		Non noto	Adeleke et al., 2001
14. L. dumoffii		Si	Brenner *etal*. 1980
15. L. erythra	2	Si	Brenner *etal*. 1985
16. L. fairfieldensis		Non noto	Thacker et al., 1991
17. L. fallonii		Non noto	Adeleke et al., 2001
18. L. feeleii		Si	Herwaldt et al., 1984
19. ***L. geestiana***		Non noto	Dennis et al., 1993
20. L. gormanii		Si	Morris*etal*. 1980
21. L. gratiana		Non noto	Bornstein et al., 1989b
22. L. gresilensis		Non noto	Lo Presti et al., 2001
23. L. hackeliae	2	Si	Brenner et al., 1985
24. L. impletisoli		Non noto	Kuroki*etal*. 2007, sp. nov.
25. L. israelensis		Non noto	Bercovier et al., 1986;
26. L. jamestowniensis		Non noto	Brenner et al., 1985
27. L. jordanis		Si	Cherry et al., 1982
28. L. lansingensis		Si	Thacker et al., 1992
29. L. londiniensis	2	Non noto	Dennis et al., 1993
30. L. longbeachae	2	Si	McKinney et al., 1981
31. L. lytica (comb. nov.)		Non noto	Drozanski 1991;Hookey *et al*. 1996,
32. L. maceachernii		Si	Brenner et al., 1985;
33. L. massiliensis		Non noto	Campocasso et al., 2012
34. L. micdadei		SI	Hebert et al., 1980
35. L. moravica		Non noto	Wilkinson et al., 1988
36. L. nagasakiensis		Si	Yang et al., 2012
37. L. nautarum		Non noto	Dennis et al., 1993
38. L. oakridgensis		SI	Orrison et al., 1983;
39. L. parisiensis		Si	Brenner et al. 1985
40. L. pittsburghensis		Si	Pasculle et al. 1980, sp. nov.
41. L. pneumophila	16	Si	Brenner et al., 1985
42. L. pneumophila**subsp.*****fraseri***		Si	Brenner et al. 1989, subsp. nov.
43. L. pneumophila **subsp.*****pascullei***		Si	Brenner et al. 1989, subsp. nov
44. L. Pneumophila **subsp. p*****neumophila***		Si	Brenner et al. 1979, subsp. nov.
45. L. quateirensis		Non noto	Dennis et al., 1993
46. ***L. quinlivanii***	2	Non noto	Benson et al., 1989
47. ***L. rowbothamii***		Non noto	Adeleke et al., 2001
48. ***L. rubrilucens***		Non noto	Brenner et al., 1985

49. ***L. sainthelensi***	2	Si	Campbell et al. 1984
50. ***L. santicrucis***		Non noto	Brenner et al., 1985
51. L. shakespearei		Non noto	Verma et al., 1992
52. L. spiritensis	2	Non noto	Brenner et al., 1985
53. L. steelei		Si	Edelstein et al., 2012
54. L. steigerwaltii		Non noto	Brenner et al., 1985
55. L. taurinensis		Non noto	Lo Presti et al., 1999
56. L. tunisiensis		Non noto	Campocasso et al., 2012
57. L. tusconensis		Si	Thacker et al., 1989
58. L. wadsworthii		Si	Edelstein, 1982a
59. L. waltersii		Non noto	Benson et al.,1996b
60. L. worsleiensis		Non noto	Dennis et al.,1993
61. L. yabuuchiae		Non noto	Kuroki et al. 2007

ALLEGATO 2: RICERCA DI LEGIONELLA IN CAMPIONI DI ORIGINE UMANA

Misure di sicurezza

Legionella è un microrganismo appartenente al gruppo 2 di rischio come indicato nel Titolo X del D. Lgs n. 81 del 9 Aprile 2008 e successive modifiche ed integrazioni (s.m.i.), i campioni in cui essa può essere presente, devono essere maneggiati da personale esperto operando con appropriati dispositivi di protezione individuale (maschere, guanti, occhiali; vedi caratteristiche nel paragrafo DPI del capitolo "Rischio di esposizione professionale") e in laboratori adeguatamente attrezzati e dotati di cappe Biohazard di classe II con certificazione di conformità alla norma tecnica EN 12469 (D. Lgs 81/2008 e s.m.i., Linee guida recanti indicazioni ai laboratori con attività di diagnosi microbiologica e controllo ambientale della legionellosi G.U. N. 29 del 5 febbraio 2005).

In aggiunta alla protezione individuale l'operatore, durante l'esecuzione della prova, deve prestare la massima attenzione a mantenere le condizioni di sterilità del campione eliminando qualsiasi possibilità di contaminazione con eventuali altri campioni o con l'ambiente.

Prelievo, trasporto e conservazione

Legionella può essere ricercata nel materiale proveniente dall'apparato respiratorio, espettorato e/o sputo, broncoaspirato, broncolavaggio, nell'essudato pleurico e pericardico e nel parenchima polmonare. Nella raccolta di questi campioni è importante evitare qualsiasi contaminazione con l'ambiente (soprattutto acqua non sterile) per prevenire falsi positivi. Tutti i campioni devono essere raccolti in contenitori sterili con tappo a vite possibilmente idonei per la centrifugazione. Quando necessario, al fine di evitare l'essiccamento dei materiali, aggiungere al campione 1-2 mL di acqua distillata sterile. Questa procedura limita l'azione di sostanze inibenti verso *Legionella* contenute in tali campioni. Non utilizzare soluzioni saline (es. soluzione fisiologia) che possono produrre un effetto inibitore su *Legionella*. Il clinico che effettuerà il broncolavaggio deve essere informato che è preferibile utilizzare acqua distillata sterile o scarse quantità di soluzione salina.

Per quanto riguarda il prelievo di tessuto polmonare durante un'autopsia, si raccomanda per evitare contaminazioni, l'uso di ferri chirurgici sterili e che il campione non venga assolutamente in contatto con acqua di rubinetto, bensì, se necessario con acqua distillata sterile.

Il patologo quindi dovrebbe selezionare quelle aree con maggior necrosi facendo campionamenti a partire dai lobi superiori e successivamente negli, inferiori e mediani. I campioni prelevati devono essere raccolti in contenitori di plastica sterili.

Il tempo che intercorre tra il decesso del paziente e il prelievo di tessuto polmonare deve essere estremamente limitato e non dovrebbe superare le 48h. *Legionella* infatti è un microrganismo aerobio e, l'assenza di ossigeno, che inizia ad essere consistente dopo 2 giorni dal decesso, può contribuire alla perdita di vitalità del germe. E' descritto infatti che quando vengono analizzati campioni di questo tipo, devono essere appena prelevati (CDC, Hospital laboratory diagnosis of *Legionella* infections. 1987), sia per quanto sopra esposto, sia per evitare l'azione di sostanze inibenti e/o la moltiplicazione di altri microrganismi interferenti.

Non è necessario l'impiego di terreni di trasporto. I campioni devono essere trasportati in laboratorio ed esaminati nel più breve tempo possibile. Se si prevede un tempo superiore a 30 min, mantenere il campione refrigerato (+5 ± 3°C) e analizzarlo entro 3 giorni. Se possibile evitare il congelamento e se necessario effettuarlo temperatura ≤ - 70±10 °C.

I campioni provenienti da un prelievo effettuato a seguito di un'autopsia, se non analizzati entro il giorno stesso del prelievo devono essere congelati a ≤ - 70±10°C.

Metodo colturale

Strumenti, materiali, terreni e reagenti

- ✓ Frigorifero in grado di mantenere una temperatura di +5 ± 3°C
- ✓ Termostato regolabile alla temperatura di 36±1°C in cui alla base è stata posta una vaschetta con acqua distillata sterile (rimboccata periodicamente quando si osserva scendere il livello) per garantire l'umidità. La presenza di CO_2 al 2,5% è utile per la crescita di alcune legionelle, ma non è essenziale;
- ✓ Centrifuga in grado di arrivare a 3000 ± 100 g;
- ✓ Micropipette 100 - 1000 µL e relativi puntali sterili, pipette sterili;
- ✓ Fluidificante a base di dithiothreitolo (preparazioni commerciali);
- ✓ Piastre BCYE agar e BCYE agar con aggiunta di supplemento selettivo (MWY, GVPC, ecc.); per la preparazione dei terreni vedi norma di riferimento allegato 5;
- ✓ Acqua distillata sterile;
- ✓ Spatole ad "L" monouso sterili;
- ✓ Nel caso in cui si debbano analizzare frammenti di tessuti fornirsi anche di omogeneizzatore Potter a pestello (con capacità di 5-10 mL);
- ✓ Pinze e Bisturi sterili;
- ✓ Piastre Petri sterili;
- ✓ Congelatore ≤ - 70±10 °C.

Procedimento

Secrezioni respiratorie (escreato, bronco lavaggio, tracheoaspirato), fluido pleurico, drenaggio toracico, ecc.

L'escreato ed il tessuto polmonare contengono sostanze inibenti lo sviluppo di *Legionella*. Pertanto, se non sono stati diluiti al momento del prelievo, è opportuno diluire i campioni in una piccola quantità (500-1000 µL) di acqua distillata sterile oppure in brodo preferibilmente non contenente NaCl. Se l'espettorato è molto denso, deve essere risospeso con 200-1000 µL di fluidificante a base di dithiothreitolo (disponibile in commercio).

E' consigliabile centrifugare i campioni, diluiti e non, per concentrare le legionelle in essi eventualmente contenute (3000±100 g per 15 min). Allo stesso modo anche le emocolture e l'omogenato di tessuto polmonare o altri campioni organici sottoposti ad analisi possono essere concentrati per centrifugazione.

I campioni dovranno essere in parte trattati a 50° C per 30 min per eliminare interferenza nella moltiplicazione di *Legionella* causata da altra flora microbica eventualmente presente.

Oppure, in alternativa, potranno essere trattati diluendoli 1:10 con una soluzione tamponata di HCl-KCl a pH 2,2[1], e mantenendoli a temperatura ambiente per 5 min.

Inoculare 0,1 mL e 0,25 mL dei campioni trattati e non trattati distribuendo il campione con una spatola sterile su 2 o più piastre di BCYE agar e due o più di BCYE agar selettivo (GVPC, MWY) (N.B. Maggiore è il numero di piastre inoculate più alta sarà la probabilità di recuperare *Legionella* dal campione).

Incubare a 36±2°C in aerobiosi, in ambiente umido, con 2,5% di CO_2, oppure in microaerofilia.

Esaminare giornalmente ed eliminare una piastra come negativa solo dopo almeno 10 giorni di incubazione. La crescita dopo 3 giorni di colonie bianco-grigie può far sospettare la presenza di *Legionella* nel campione in esame. Procedere con gli opportuni test identificativi per *Legionella* (Allegato 5).

Tessuti (polmonare, renale, ecc.)

1. Prima di omogeneizzare il frammento di tessuto, prenderlo con una pinza sterile e strisciarlo su una piastra di terreno selettivo e non selettivo;
2. Porre il tessuto su una piastra Petri sterile;
3. Dopo aver selezionato una porzione di tessuto densa grigia o rossastra, tagliare una piccola sezione (più grande possibile, ma in grado di essere contenuta nell'omogeneizzatore) aiutandosi con le pinze e bisturi sterili;
4. Trasferire il campione con le pinze all'interno di un omogeneizzatore Potter;
5. Aggiungere 500 -1000 µL di acqua distillata sterile;
6. Omogeneizzare il tessuto con il pistone;
7. Prelevare metà della sospensione e trattarla per 30 min a 50 °C;
8. Inoculare 100 e 250 µL su una o più piastre di BCYE sia del campione non trattato che trattato al calore che del non trattato, distribuendo il campione sulla piastra con una spatola;
9. Incubare per 10 gg circa osservando le piastre quotidianamente.

Le colonie di *Legionella*, se presenti nel campione, saranno visibili mediamente dopo un periodo ≥ a 3 giorni in qual caso si procede con gli opportuni test identificativi (Allegato 5).

Immunofluorescenza diretta (DFA)

I campioni clinici da analizzare possono essere freschi o congelati di recente provenienti da secrezioni respiratorie o da tessuti polmonare, renale, ecc..

Strumenti, materiali e reagenti

- ✓ Microscopio ottico per osservazione in fluorescenza corredato di obiettivo 25x e possibilmente 50x;
- ✓ Incubatore a 36±1°C;
- ✓ Omogeneizzatore a pestello Potter (con provette di capacità 5-10 mL);
- ✓ Pinze sterili;
- ✓ Bisturi sterili;
- ✓ Piastre Petri sterili;
- ✓ Micropipette, 20, 200, 1000 µL e relativi puntali sterili;

[1] Soluzione tamponata a pH 2,2: 3,9 mL di HCl 0,2 M + 25 ml di KCl 0,2 M, aggiustare a pH 2,2 con KOH 1 M, sterilizzare per filtrazione oppure in autoclave a 121°C per 15 min.

- ✓ Pipette monouso sterili 1-2 mL;
- ✓ Bruciatore Bunsen;
- ✓ Vaschette portavetrini
- ✓ Vetrini per osservazione in immunofluorescenza (fondo scuro, pozzetti diametro 5 mm) o quelli forniti in genere dai kit (pozzetto diametro 15 mm);
- ✓ Vetrini coprioggetto;
- ✓ Carta bibula;
- ✓ Camera umidificata (piastra Petri o altra scatola di plastica con all'interno carta bibula bagnata con acqua distillata);
- ✓ Olio per immersione;
- ✓ Reagente per *Legionella pneumophila* (anticorpo monoclonale marcato con Isotiocianato di Fluoresceina (FITC), in grado di identificare tutti i sierogruppi di *Legionella pneumophila*);
- ✓ Sospensione antigenica di controllo positivo (*Legionella pneumophila*) fornita solitamente nel kit commerciale;
- ✓ Sospensione antigenica di controllo negativo (*E.coli ATCC n 25922* o altro ceppo identificato in laboratorio come E.coli);
- ✓ Acqua distillata sterile;
- ✓ Liquido di montaggio;
- ✓ Formalina 10%;
- ✓ Fluidificante a base di dithiothreitolo (disponibile in commercio).

Procedimento

Tessuti (polmonare, renale, ecc.)

- ✓ Pulire il vetrino e scrivere con una matita, il nome identificativo del campione,
- ✓ Seguire quanto indicato ai punti da 2 a 6 nella sezione Metodo Colturale al paragrafo Tessuti Dopo aver risospeso bene il campione si prelevano 4 µLe si stratificano su almeno tre pozzetti di un vetrino per immunofluorescenza, altri 4 µL vengono stratificati e poi aspirati (per avere una minore quantità di tessuto). Se si usano i vetrini del kit eseguire uno striscio all'interno del pozzetto con un bastoncino sterile;
- ✓ Lasciare asciugare i vetrini all'aria;
- ✓ Passare alla fiamma di un bruciatore Bunsen per due volte tenendo il vetrino con la pinza;
- ✓ Mettere su ogni pozzetto 5 µL di formalina al 10% in PBS (oppure coprire con formalina 10% se si usano i vetrini del kit);
- ✓ Lasciare agire per 10 min;
- ✓ Sciacquare con acqua distillata sterile per drenare la formalina;
- ✓ Immergere il vetrino nella stessa soluzione per 2±1 minuti in vaschetta porta vetrini contenente acqua distillata;
- ✓ Lasciare asciugare il vetrino all'aria o tamponarlo delicatamente tra due fogli di carta bibula;
- ✓ Aggiungere 4 µL anticorpo anti *Legionella pneumophila* coniugato con FITC (se si usano i vetrini con pozzetto di diametro 5 mm) o una-due gocce se si usano i vetrini di 15mm;
- ✓ Incubare a 37°C in camera umida per 30 minuti;
- ✓ Passare sul vetrino PBS 1x ed immergere il vetrino nella stessa soluzione per 5' in vaschetta porta vetrini;
- ✓ Asciugare delicatamente tra due fogli di carta bibula;

- ✓ Far cadere con una pipetta sul vetrino 2-3 gocce di liquido di montaggio;
- ✓ Appoggiare il vetrino copri oggetto;
- ✓ Osservare al microscopio a fluorescenza con obiettivo 25x o 50x ad immersione.

Secrezioni respiratorie (escreato, bronco lavaggio, tracheoaspirato), fluido pleurico, drenaggio toracico, ecc.

Se l'escreato si presenta denso può essere eventualmente fluidificato con 200-1000 µL di fluidificante a base di dithiothreitolo (disponibile in commercio).

Poiché in questi campioni le legionelle sono usualmente presenti in basse concentrazioni è importante sottoporli a centrifugazione a 3000±100 g per 15 min.

Risospendere il sedimento in acqua distillata sterile ad 1/10 del volume;

Strisciare una piccola quantità del sedimento sul pozzetto ricoprendolo totalmente;

Seguire poi i punti indicati sopra indicati nel paragrafo Tessuti.

Controllo Positivo

- ✓ Pulire ed etichettare un vetrino per microscopio a fluorescenza (questo vetrino deve essere analizzato separatamente da quello dei campioni del paziente) ed incubarlo in una camera umida dedicata;
- ✓ Agitare il flacone contenente la sospensione antigenica di controllo positivo;
- ✓ Poggiare 1-2 gocce di sospensione in un pozzetto del vetrino (o 5 µL se si usano vetrini con pozzetto dal diametro di 5 mm);
- ✓ Aspirare il liquido mediante una pipetta;
- ✓ Lasciare asciugare all'aria, quindi fissare al calore il campione facendo passare per due volte rapidamente il campione attraverso la fiamma del bruciatore Bunsen;
- ✓ Sciacquare con PBS 1x ed immergere nella stessa soluzione per 5';
- ✓ Colorare con anticorpo coniugato con FITC e procedere come per il campione.

Controllo negativo

- ✓ Usare una coltura di *E. coli* (in genere fornita dal kit);
- ✓ Pulire ed etichettare un vetrino per microscopio a fluorescenza;
- ✓ Se non fornita dal kit preparare una sospensione batterica in formalina 10% pari circa ad uno standard Mac Farland 1;
- ✓ Lasciare agire per 10 minuti;
- ✓ Colorare con anticorpo coniugato con FITC e procedere come per il campione.

Risultati

L'osservazione al microscopio a fluorescenza in obiettivo 25X o 50X di batteri in forma di bacilli colorati verde mela indica la presenza di *Legionella pneumophila*:

- ➢ più di 5 batteri fluorescenti per vetrino a due pozzetti: test positivo.
- ➢ 1-5 batteri fluorescenti per vetrino a due pozzetti: riportare il numero di cellule colorate se possibile richiedere un secondo campione; confermare con la coltura.
- ➢ nessun batterio fluorescente rilevabile: test negativo.

Preparazione dei reagenti

• PBS 10X
Idrogeno fosfato di disodio (Na_2HPO_4) 12,36g
(oppure $Na_2HPO_4\ 2H_2O$) 15,50g
Sodio fosfato monoidrato ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) 1,80g
Cloruro di Sodio (NaCl) 85,00g
Portare ad un litro con H_2O distillata;
La soluzione di lavoro è PBS 1X (0,01 M pH 7,6)

• **Liquido di Montaggio**
Soluzione tampone 0,5 M pH 9
a) Carbonato di sodio (Na_2CO_3) 5,3 g sciolti in 100 mL di H_2O
b) Bicarbonato di sodio ($NaHCO_3$) 4,2 g sciolti in 100 mL di H_2O
Mescolare 4,4 ml di a) con 100 ml di b)
Il pH dovrebbe essere 9.0. Tuttavia per correggerlo si possono aggiungere non più di 17 mL di a) nei 100 mL di b).

Glicerina tamponata di montaggio
Soluzione tampone 0,5 M pH 9 1 mL
Glicerina neutra 9 mL
Mescolare con un magnete ma **non** agitare.
Mantenere al buio avvolgendo la bottiglia con carta argentata.

Determinazione della presenza di DNA di Legionella mediante Real Time PCR

Strumenti, materiali e reagenti

- ✓ Frigorifero in grado di mantenere una temperatura di +5 ± 3°C
- ✓ Centrifuga in grado di arrivare a 11000 ± 100 g
- ✓ Micropipette10-100-1000 µL e relativi puntali sterili con filtro
- ✓ Provette eppendorf sterili da 1.5 mL
- ✓ Provette eppendorf sterili da 0.2 mL
- ✓ Thermocycler
- ✓ PBS
- ✓ Proteinase K
- ✓ Etanolo (96-100%)
- ✓ Kit di estrazione di DNA da liquidi corporei/tessuti*
- ✓ Primers e sonde per l'amplificazione di geni specifici per *Legionella pneumophila* e eventualmente anche Legionella specie
- ✓ DNA di Legionella come controllo positivo
- ✓ Tris-EDTA (TE) buffer nuclease-free
- ✓ H_2O nuclease-free

*Per l'estrazione di DNA genomico sia da secrezioni respiratorie sia da tessuto è consigliabile l'uso di sistemi di estrazione automatizzati, che limitano le cross-contaminazioni, garantiscono riproducibilità, essendo indipendente dell'operatore, possono meglio eliminare e/o evitare la concentrazione di sostanze inibenti.

Procedimento

Secrezioni respiratorie (escreato, bronco lavaggio, tracheoaspirato), fluido pleurico, drenaggio toracico, ecc. e tessuto polmonare

Prelevare 200 µL dal volume di secrezione respiratoria o tessuto ottenuto dopo fluidificazione o omogeneizzazione (evitando l'uso di brodo di coltura come indicato nella sezione "Metodo colturale"). Nel caso in cui il volume disponibile fosse inferiore a 200 µL è

possibile compensare con il volume necessario di PBS. Quindi procedere con l'estrazione del DNA seguendo il manuale di istruzioni del Kit utilizzato. Dopo l'eluizione, prelevare 5 μL di DNA per l'analisi mediante Real Time PCR. Ad oggi i kits per analisi di campioni clinici mediante Real Time PCR disponibili in commercio sono ben pochi e per lo più specifici per *Legionella pneumophila*. Per l'uso di sistemi in "house", si consiglia l'uso di sistemi che siano oggetto di Controlli di Qualità Esterni (EQA). In ogni caso i campioni possono essere inviati al Laboratorio di Riferimento Nazionale.

Determinazione dell'antigene urinario

Il test dell'antigene urinario è molto semplice e rapido da eseguire. Di seguito tuttavia si riporta una breve procedura per evitare possibili falsi positivi:

- ✓ bollire 0,5-1 mL di urine per 5 minuti
- ✓ centrifugare a 12000 g per 2 min.
- ✓ trasferire il sopranatante in un'altra provetta e analizzarlo con il test in uso nel proprio laboratorio.

Risultati

Per quanto riguarda il test immunocromatografico, la presenza di una banda, seppure debole, indice di positività al test. In questo caso sono tuttavia auspicabili metodi aggiuntivi a supporto della diagnosi, come la ricerca di anticorpi specifici e il metodo colturale. Inoltre, si deve puntualizzare che l'esito diagnostico va comunque valutato in relazione al quadro clinico del paziente (presenza di polmonite).

Per quanto riguarda il test EIA per la determinazione dei risultati, riferirsi ai livelli di cut off riportati dal produttore**.**

ALLEGATO 3:CAMPIONAMENTO DI MATRICI AMBIENTALI PER LA RICERCA DI LEGIONELLA

Misure di sicurezza

Legionella è un microrganismo appartenente al gruppo 2 di rischio come indicato nel Titolo X del dal DLgs n. 81 del 9 Aprile 2008 e s.m.i.. Considerando che la modalità di trasmissione dell'infezione è attraverso inalazione di aerosol si deve valutare attentamente qualsiasi fase della prova che lo generi. I campioni in cui essa può essere presente, devono essere maneggiati da personale esperto operando con appropriati dispositivi di protezione individuale (maschere, guanti, occhiali; vedi caratteristiche nel paragrafo DPI del capitolo "Rischio di esposizione professionale") e in laboratori adeguatamente attrezzati e dotati di cappe Biohazard di classe II con certificazione di conformità alla norma tecnica EN 12469 (D. Lgs 81/2008 e s.m.i., Linee guida recanti indicazioni ai laboratori con attività di diagnosi microbiologica e controllo ambientale della legionellosi G.U. N. 29 del 5 febbraio 2005).

In aggiunta alla protezione individuale l'operatore, durante l'esecuzione della prova, deve prestare la massima attenzione a mantenere le condizioni di sterilità del campione eliminando qualsiasi possibilità di contaminazione con eventuali altri campioni o con l'ambiente.

Il tecnico che preleva i campioni non deve appartenere ad una categoria a rischio (persone che sono sottoposte a trattamento con corticosteroidi, che abbiano affezioni croniche a carico dell'apparato respiratorio, diabetici, ecc.) ed è raccomandato che:

- Indossi quando necessario (ad es. in campionamenti in cui non è possibile lo spegnimento di torri di raffreddamento che determinano, nei confronti del campionatore, un'esposizione a rischio) dispositivi di protezione individuale
- Minimizzi la formazione di aerosol facendo scorrere l'acqua delicatamente dall'erogatore oggetto del campionamento
- Eviti l'esposizione ad aerosol

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

Il presente allegato riporta le modalità per effettuare il campionamento di matrici ambientali di *Legionella* annullando e sostituendo quanto riportato nelle "Linee guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi" del 2000. Tali indicazioni sono il frutto dell'esperienza maturata dal laboratorio nazionale di riferimento per le legionelle, dai laboratori regionali di riferimento e da altri laboratori di rilevanza scientifica nell'applicazione delle norme delle sopra citate Linee guida e delle norme iso11731- 1 "Water quality-detection and enumeration of *Legionella*" del 1998 e "Water quality- detection and enumeration of *Legionella*" parte 2 "Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts" del 2004 e tengono conto delle informative del gruppo di lavoro ISO per l'accorpamento e revisione delle suddette norme.

Le indicazioni, riportate a seguire, valgono sia per un campionamento da eseguirsi ad opera di Ente di Controllo Pubblico, sia per un campionamento di autocontrollo di routine.

La buona riuscita di un'analisi per la ricerca di *Legionella* dipende da un prelievo corretto, pertanto tale operazione deve essere effettuata o supervisionata da personale esperto opportunamente formato che conosca:

- Il rischio per sé e per gli altri di trasmissione del batterio dai siti potenzialmente contaminati.
- L'ecologia di *Legionella*.
- I fattori che ne favoriscono la sopravvivenza e la crescita.
- Gli elementi di base del campionamento microbiologico, in particolare il concetto di sterilità.
- A questo proposito è importante adottare appropriate precauzioni per eliminare cross-contaminazione tra i siti di campionamento, specialmente quando si raccolgono campioni ad immersione (serbatoi, bacini di raccolta delle torri di raffreddamento). Ad esempio cambiare i guanti ogni volta che si effettua un campionamento ad immersione, alternativamente le mani dell'operatore devono essere disinfettate con alcool isopropilico (propanolo) o etanolo al 70% v/v. Anche la superficie esterna delle bottiglie non deve essere contaminata. Se c'è qualsiasi dubbio in proposito, la bottiglia deve essere eliminata o disinfettata con alcool isopropilico (propanolo) o etanolo al 70% v/v prima dell'uso.

Prima di effettuare il campionamento, è necessario raccogliere (od aggiornare) le seguenti informazioni relative all'impianto idrico od aeraulico oggetto del monitoraggio:

- Schema della rete idrica (qualora esistente)
- Localizzazione della tubazione di alimentazione idrica alla rete
- Localizzazione degli eventuali serbatoi d'acqua calda e fredda e di tutti i sistemi che possano generare aerosol d'acqua
- Presenza di linee di distribuzione idrica contraddistinte da stagnazione/scarso ricambio idrico (ad es. camere non utilizzate per tempi superiori ai 7 giorni)
- Vetustà dell'impianto
- Distribuzione di ciascun impianto idrico a rischio
- Presenza di sistemi di disinfezione in continuo installati sull'impianto idro-sanitario, (tipo di impianto, caratteristiche del disinfettante, modalità di monitoraggio delle concentrazioni del disinfettante, ecc.)
- Distribuzione di ciascun impianto aeraulico a rischio
- Registro di manutenzione con tutti gli interventi ordinari e straordinari effettuati sugli impianti

Qualora il Registro di Controllo fosse ancora da redigere, raccogliere informazioni su eventuali lavori svolti o su interventi di disinfezione effettuati.

Materiale occorrente

- ✓ Borsa sempre pronta con tutte le attrezzature e i materiali necessari e dispositivi di protezione individuale (guanti, maschere, occhiali)
- ✓ Borsa isotermica per il trasporto dei campioni
- ✓ Uno schema dove registrare i dettagli del campionamento effettuato (luogo, temperatura, stanza, volume d'acqua prelevato, condizioni particolari del sito, ruggine, calcare, conformità con le leggi vigenti, ecc.; vedere più avanti "Schema di campionamento")
- ✓ Bottiglie sterili con capacità minima di 1 L preferibilmente di vetro o polietilene o contenitori simili, contenenti una concentrazione di tiosolfato di sodio pentaidrato (come indicato nella norma UNI EN ISO19458 al punto 4.2.3), quando sappiamo che potrebbe essere stato utilizzato cloro come sistema di disinfezione, altrimenti se il sistema di disinfezione utilizza ioni rame o argento si neutralizza con EDTA (come indicato nella norma UNI EN ISO19458 alla nota del punto 4.2.3)

- ✓ Contenitori sterili con capacità (5-10 L) per campionare acqua proveniente dall'acquedotto o acqua sospetta di essere fonte di infezione ma che si trova ad una bassa temperatura
- ✓ Bottiglie sterili (preferibilmente di vetro, polietilene, polipropilene o altra plastica sterile)
- ✓ Contenitori in vetro o polietilene sterili per la raccolta di depositi e incrostazioni
- ✓ Buste di plastica sterili per convogliare il flusso della doccia
- ✓ Tamponi sterili (cotone, poliestere o altro materiale)
- ✓ Provette con 2-5 mL di acqua sterile
- ✓ Disinfettante: etanolo al 70% v/v o propanolo al 70% v/v, ipoclorito di sodio al 10% (possibilmente in confezione spray)
- ✓ Bisturi sterili
- ✓ Termometro tarato, preferibilmente digitale con sensibilità 0,1 °C
- ✓ Flambatore
- ✓ Pennarelli resistenti all'acqua o etichette
- ✓ Pinze sterili
- ✓ Elastici
- ✓ Forbici
- ✓ Torcia elettrica
- ✓ Macchina fotografica
- ✓ Alcool isopropilico (propanolo) 70%, possibilmente spray.

Campionamento

E' necessario che i campioni siano univocamente identificati e univocamente correlati a quanto riportato nello schema di registrazione e quindi mostrare sempre un'attenta osservanza di procedure di registrazione e marcatura dei campioni.

Legionella sarà ricercata nell'ambiente idrico artificiale (impianti d'acqua destinata al consumo umano, impianti aeraulici, impianti di raffreddamento a torri evaporative/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 ai punti che maggiormente possono essere critici, sia in base allo schema di ciascun impianto a rischio sia in funzione dei dati epidemiologici.

I campioni sono rappresentati principalmente da:

- ➢ acqua del circuito dell'acqua calda sanitaria e di quello dell'acqua fredda sanitaria soprattutto qualora, per quest'ultima tipologia d'impianto, 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 attaccato alle superfici interne delle tubazioni, allo sbocco di rubinetti, nei filtri rompigetto, 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.

Impianti idrosanitari

Nella rete idrosanitaria, nonostante sia maggiore la probabilità di riscontrare il batterio nell'impianto di distribuzione dell'acqua calda, è necessario effettuare anche il campionamento dell'impianto di distribuzione dell'acqua fredda sanitaria da effettuarsi in relazione agli esiti della valutazione del rischio e negli altri casi indicati nel presente documento (es. verificarsi di un caso).

Il percorso dell'acqua dovrebbe essere monitorato dal suo punto di partenza (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 (erogatori sentinella).

A seguire, si riporta l'elenco dei principali punti di controllo, da utilizzarsi come riferimento per la definizione della più opportuna mappatura analitica della rete idrica oggetto d'indagine:

- ✓ Allacciamento all'acquedotto od al punto d'emungimento d'acqua di pozzo
- ✓ Accumuli 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. Quando questa è ≤ 20 °C il numero dei campioni può essere ridotto. La definizione di quali e quanti punti di controllo sottoporre a campionamento deve essere motivata dalla valutazione del rischio legionellosi, così come la frequenza d'esecuzione di tali controlli analitici.

Impianti di raffreddamento a torri evaporative/condensatori evaporativi

I campioni devono essere prelevati dal bacino (tenendosi lontani dal punto di immissione dell'acqua tramite galleggiante) e/o dal ritorno caldo dalle utenze (torri evaporative).

E' sufficiente (a meno di risultanze diverse derivanti dalla valutazione del rischio legionellosi) il prelievo di un campione per ciascun impianto di raffreddamento.

E' opportuno, in presenza di eventi epidemici, effettuare anche un campionamento dell'aria che viene espulsa dalle torri /condensatori evaporativi.

Modalità di prelievo

Acqua calda

Il volume consigliabile è di almeno 1 litro.

Per la ricerca di *Legionella*, in condizioni di utilizzo comune (ossia un campione istantaneo per simulare l'eventuale esposizione da parte di un utente), prelevare senza flambare o disinfettare al punto di sbocco e senza far scorrere precedentemente l'acqua e misurare la temperatura.

Per una ricerca di *Legionella* all'interno dell'impianto (ossia per monitorarne le sue condizioni d'igiene):

- far scorrere l'acqua per almeno un minuto;
- chiudere il flusso e flambare all'interno e all'esterno dello sbocco, (quando la flambatura è tecnicamente possibile) oppure disinfettare con ipoclorito al 1% o etanolo al 70% lasciando agire il disinfettante almeno per 60 secondi;
- fare scorrere l'acqua ancora per almeno 1 minuto per rimuovere l'eventuale disinfettante;
- misurare la temperatura ponendo il termometro nel flusso d'acqua e aspettando il tempo necessario affinché raggiunga un valore pressoché costante;
- prelevare il campione.

Si suggerisce l'applicazione di questa modalità di campionamento in occasione dell'esecuzione dei monitoraggi microbiologici di autocontrollo di routine.

Acqua fredda

Per la ricerca di *Legionella* in condizioni di utilizzo comune prelevare senza flambare o disinfettare al punto di sbocco e senza far scorrere precedentemente l'acqua e misurare la temperatura ponendo il termometro al centro del flusso. Quindi prelevare il 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 ≤ 20°C il numero di campioni può essere ridotto.

Depositi o sedimenti.

Prelevare dallo scarico oppure dal fondo della raccolta di acqua, una quantità > 5mL dopo aver eliminato l'acqua dall'alto. Raccogliere in recipienti sterili di vetro o altro materiale monouso.

Incrostazioni

Prelevare da tubature e serbatoi, staccando meccanicamente con bisturi sterile il materiale depositatosi all'interno. Raccogliere in recipienti sterili di vetro o altro materiale monouso contenente una piccola quantità (2-5 mL) di soluzione Ringer o Page o acqua sterile.

Biofilm

Con un tampone sterile raccogliere il materiale depositato sulle superfici interne o esterne del punto terminale (effettuare il prelievo prima di aprire il flusso d'acqua, dopo aver smontato il rompi getto o il diffusore della doccia). Conservare il tampone in recipiente di vetro o altro materiale monouso (provetta) con tappo, contenente una piccola quantità (2-5 mL) di soluzione Ringer o Page o acqua sterile

Filtri

Il controllo deve essere eseguito su filtri utilizzati da diverso tempo, e non su quelli lavati o sostituiti di recente. Prelevare il filtro o una porzione di esso se è di grandi dimensioni e conservarlo in un sacchetto di plastica sterile.

Trasporto e conservazione

I campioni prelevati devono essere consegnati subito affinché l'analisi possa essere iniziata preferibilmente entro le 24 ore dal prelievo e trasportati a temperatura ambiente, al riparo dalla luce, avendo cura di separare i campioni di acqua calda da quelli di acqua fredda.

Trascorse le 24 ore i campioni devono essere conservati necessariamente +5°C ± 3°C e successivamente trasportati in un contenitore in grado di mantenere tale temperatura e consegnati in tempo utile affinché l'analisi venga iniziata il più presto possibile e comunque **non oltre** i 4 giorni dal prelievo.

Schema di campionamento

Campione di: acqua ☐biofilm☐ altro ☐
…….....

Prelevato il ……Quantità : 1 Litro ☐ altro ☐
…….……..

Presso…….……

N° camp.	Sito prelievo	Scorrimento Si	No	Temperatura °C
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

Campionamento effettuato a seguito di :

- controllo in seguito ad un caso ☐
- cluster ☐
- epidemia, altro (specificare) ☐
- controllo di routine ☐

Note……
……
Inizio analisi: data……. Ora…….
Presso…….....**.....**
……

ALLEGATO 4: RICERCA E QUANTIFICAZIONE DI LEGIONELLA IN CAMPIONI AMBIENTALI

Misure di sicurezza

Legionella è un microrganismo appartenente al gruppo 2 di rischio come indicato nel Titolo X del D. Lgs n. 81/2008 e s.m.i. Considerando che la modalità di rasmissione dell'infezione è attraverso inalazione di aerosol si deve valutare attentamente qualsiasi fase della prova che lo generi. I campioni in cui essa può essere presente, devono essere maneggiati da personale esperto operando con appropriati dispositivi di protezione individuale (maschere, guanti, occhiali; vedi caratteristiche nel paragrafo DPI del capitolo "Rischio di esposizione professionale") e in laboratori adeguatamente attrezzati e dotati di cappe Biohazard di classe II con certificazione di conformità alla norma tecnica EN 12469 (D.Lgs 81/2008 e s.m.i., Linee guida recanti indicazioni ai laboratori con attività di diagnosi microbiologica e controllo ambientale della legionellosi G.U. N. 29 del 5 febbraio 2005).

In aggiunta alla protezione individuale l'operatore, durante l'esecuzione della prova, deve prestare la massima attenzione a mantenere le condizioni di sterilità del campione eliminando qualsiasi possibilità di cross-contaminazione con eventuali altri campioni attraverso ad esempio imbuti e/o porta filtro della rampa o altro sistema filtrante utilizzato, pinzette ecc.

Il presente allegato riporta il metodo d'analisi per la ricerca e quantificazione di *Legionella* nei campioni ambientali annullando e sostituendo quanto riportato nelle "Linee guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi" del 2000. Tali indicazioni sono il frutto dell'esperienza maturata dal laboratorio nazionale di riferimento per le legionelle, dai laboratori regionali di riferimento e da altri laboratori di rilevanza scientifica nell'applicazione delle norme delle "Linee guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi" del 2000 e delle ISO11731:1998"Water quality-detection and enumeration of *Legionella*" e ISO 11731-2: 2004 "Water quality-detection and enumeration of *Legionella*": "Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts".

Strumenti e Materiali

- ✓ Sistema filtrante costituito da beuta da vuoto in vetro con portafiltro sterile, imbuto sterile e pinza, oppure rampa per filtrazione sottovuoto corredata di imbuti sterili o sistemi simili
- ✓ Pompa da vuoto regolata ad una pressione di circa 500-550 mm Hg
- ✓ Membrane sterili di policarbonato, nylon o esteri misti di cellulosa di 47 mm di diametro e con porosità di 0,22 o 0,45 µm; l'uso di membrane nere può essere d'ausilio per il riconoscimento delle colonie quando si applica il procedimento di conteggio diretto su membrana.
- ✓ Centrifuga refrigerata in grado di arrivare a 6000 ± 100 g
- ✓ Bagno termostatico regolabile a 50 ± 1 °C
- ✓ Termostato regolabile alla temperatura di 36±2°C in cui alla base è stata posta una vaschetta con acqua distillata sterile (rimboccata periodicamente quando si osserva

scendere il livello) per garantire l'umidità. La presenza di CO_2 al 2,5 ± 1 % è utile per la crescita di alcune legionelle, ma non è essenziale
- ✓ Cilindri sterili per eventuale misurazione del volume
- ✓ Raschietti (scrapers) sterili per colture cellulari
- ✓ Barattoli di vetro o polistirene, piastre Petri, provette polipropilene (50 mL) o buste sterili o provette di vetro con all'interno palline di vetro del diametro di 3 mm sterili
- ✓ Micropipette100-1000 µL e relativi puntali sterili, pipette sterili
- ✓ Spatole ad "L" monouso sterili
- ✓ Forbici sterili
- ✓ Becco Bunsen
- ✓ Provette in vetro o altro materiale monouso (5-10 mL) per effettuare diluizioni
- ✓ Frigorifero in grado di mantenere una temperatura di +5 ± 3°C
- ✓ Bilancia analitica con sensibilità 0,01 mg
- ✓ Pipette graduate 2-10 mL sterili o monouso sterili
- ✓ pHmetro con sensibilità di almeno 0,1 unità di pH

Terreni e diluenti

In aggiunta ai terreni e supplementi selettivi indicati nella norma ISO 11731:1998 si può prendere in considerazione l'uso di BCYE (Ditommaso S. et al., 2011)*, già previsto dalla ISO 11731-2: 2004 per la determinazione di *Legionella* in campioni con bassa concentrazione batterica, e del supplemento selettivo di Wadowsky e Yee (MWY) contenente glicina, vancomicina, polimixina B, anisomicina, blu di bromotimolo, porpora bromo cresolo che è così composto su un volume di 100 mL:

Glicina……300mg
Polimixina B solfato……..5000 U.I.
Anisomicina……8,0 mg
Vancomicina……...0,1mg
Blu di bromo timolo……...1,0 mg
Porpora di bromo cresolo… .1,0 mg

*L'uso del BCYE, in aggiunta ad un terreno selettivo, si è rivelato molto utile per avere un maggior recupero di legionelle e un maggiore isolamento di *Legionella* non-*pneumophila*. Per questo motivo se ne consiglia l'utilizzo.

La letteratura scientifica internazionale ha dimostrato la sostanziale equivalenza tra GVPC e MWY (Leoni E. et al 2001; Reinthaler et al , 1993; Edelstein P et al 1982).

Modalità di preparazione

- ➢ Aggiungere un' appropriata quantità di polimixina B solfato a 100 mL d'acqua per raggiungere una concentrazione pari a 10000 UI/mL. Mescolare e decontaminare mediante filtrazione per membrana. Dispensare in aliquote da 5 ml in contenitori sterili e conservare a -20±3 °C. Scongelare a temperatura ambiente prima dell'uso.
- ➢ Aggiungere 20 mg di vancomicina idrocloruro a 20 mL d'acqua, mescolare e decontaminare mediante filtrazione per membrana. Dispensare in aliquote da 1 mL in

contenitori sterili e conservare a 20±3 °C. Scongelare a temperatura ambiente prima dell'uso.

- Aggiungere 2 g di anisomicina a 100 mL di etanolo e decontaminare mediante filtrazione per membrana. Dispensare in 4 mL in contenitori sterili.
- Aggiungere 10 mg di blu di bromotimolo a 10 mL d'acqua, mescolare e decontaminare mediante filtrazione per membrana.
- Aggiungere 10 mg di porpora di bromo cresolo a 10 mL d'acqua, mescolare e decontaminare mediante filtrazione per membrana.
- Gli antibiotici (ad eccezione della anisomicina) possono essere conservati fino a 6 mesi quando sono congelati. Questo supplemento selettivo va aggiunto al BCYE, dopo aver aggiunto α–ketoglutarato e 3 g di glicina priva di ammonio e aver aggiustato il pH a 6,8±0,2.

Per il controllo di qualità dei terreni valutare la crescita sia di *Legionella pneumophila* che *Legionella bozemanii.*

In alternativa si possono utilizzare terreni e reagenti deidratati seguendo per la preparazione le indicazioni fornite dalle case produttrici.

Si può inoltre prendere in considerazione la possibilità di utilizzare tutti i terreni sopra citati già pronti in piastra sottoponendoli a controllo di qualità, qualora non fosse stato effettuato dalla ditta produttrice. In questo caso verificare sempre la data di scadenza e seguire le istruzioni per la conservazione e l'utilizzo indicate dal produttore.

Soluzione PAGE

Cloruro di sodio (NaCl) 0,120 g
Solfato di magnesio ($MgSO_4 . 7H_2O$) 0,004 g
Cloruro di calcio ($CaCl_2 . 2H_2O$) 0,004 g
Idrogenofosfato di disodio (Na_2HPO_4) 0,142 g
Diidrogeno fosfato di potassio (KH_2PO_4) 0,136 g
Aqua distillata 1000 mL
Dissolvere i sali nell'acqua, mescolare bene e autoclavare a (121 ± 3) °C per (20 ± 1) min.

NOTA. Per una preparazione accurata preparare una soluzione 10X e poi diluire 1:10 con acqua distillata sterile.

Soluzione Ringer

Cloruro di sodio (NaCl) 8,6 g
Cloruro di potassio (KCl) 0,3 g
Cloruro di Calcio ($CaCl_2$) 0,33 g
Acqua distillata 1000 mL
Dissolvere i sali nell'acqua, mescolare bene, diluire 1:40, dispensare in aliquote e sterilizzare in autoclave a (121 ± 3) °C per (20 ± 1) min.

Conservare le soluzioni PAGE e Ringer in frigo a 5±3°C per 3 mesi.

Procedimento per campioni ambientali a matrice acquosa

Concentrazione per filtrazione

- Agitare bene il campione d'acqua manualmente per staccare le legionelle che aderiscono alle pareti del contenitore, soprattutto se è di plastica (questo avviene in particolare durante il trasporto e la conservazione)
- Se ci si attende una concentrazione maggiore o uguale a 10^5 si può seminare direttamente il campione (da 0,1 a 0,5 mL) anche prima della concentrazione
- Se si presume che il campione abbia una bassa concentrazione di legionelle si suggerisce l'uso del metodo basato sulla semina diretta della membrana (vedi di seguito)
- Il campione d'acqua può essere filtrato attraverso membrane sterili di policarbonato o nylon o esteri misti di cellulosa con porosità pari a 0,22-0,45 µm poste su apparati filtranti di vario genere (sistemi composti da beute da vuoto o rampe per filtrazione)
- Filtrare attraverso una pompa da vuoto, esercitando preferibilmente una pressione di circa 500-550 mm Hg (per evitare stress alle legionelle)
- Se il campione ha un volume maggiore di un litro o è particolarmente contaminato si possono usare anche più membrane in successione oppure prevedere una centrifugazione (vedi di seguito)
- Al termine della filtrazione la membrana viene prelevata con pinzette sterili e posta in un contenitore di vetro o in provetta in plastica monouso sterile di capacità adeguata e richiudibile, contenente 10 ml di diluente (soluzione Ringer o Page, vedere la composizione nella nota del presente Allegato) o con l'acqua dello stesso campione. Si procede quindi al distacco dei microrganismi che sono stati trattenuti, pipettando ripetutamente il diluente sulla membrana, oppure mediante sfregamento della pipetta sulla membrana stessa, oppure si può procedere anche allo sminuzzamento della membrana con forbici sterili. In alternativa si può usare una piastra Petri di 90 mm con 5-10 mL di diluente (soluzione Ringer o Page o acqua dello stesso campione), rimuovere i batteri adesi alla membrana con uno scraper o una spatola (passarlo almeno due volte sull'intera membrana) e trasferire poi il volume di diluente in una provetta di plastica monouso sterile
- Si procede poi ad una agitazione vigorosa per 2' con il vortex
- In alternativa si possono utilizzare anche buste sterili dove si colloca la membrana con il diluente e poi si procede al massaggio con le dita attraverso la busta della membrana stessa per almeno 30'' per rimuovere i batteri e ad un trattamento in bagno ad ultrasuoni (vedi punto successivo)
- Se si possiede un bagno ad ultrasuoni è consigliabile trattare il concentrato da 2 a 10 minuti in alternativa al vortex; assicurarsi che il livello di diluente che copre la membrana sia sotto il livello dell'acqua nella vasca ad ultrasuoni
- Il campione così ottenuto rappresenta il concentrato da utilizzare per l'inoculo. Effettuare subito la semina e conservarlo in frigorifero a +5 ± 3°C per un periodo massimo di 7 giorni (N.B. In presenza di epidemie si raccomanda la conservazione del rimanente concentrato fino alla completa esecuzione di tutte le indagini ambientali ed epidemiologiche)
- Trattamento al calore e/o con soluzione acida[1]. Quando del campione si conosce l'entità di contaminazione da microrganismi interferenti si può adottare un trattamento o l'altro. Ad esempio si presume che acque provenienti da sistemi idrici sottoposti a trattamento di disinfezione abbiano una bassa contaminazione e pertanto un solo trattamento è sufficiente. Al contrario acque provenienti da sistemi idrici non sottoposte a disinfezione e quindi presumibilmente contaminate saranno trattate con entrambe le modalità. Per campioni, in cui è visibile anche ad occhio nudo una considerevole presenza di detriti o altro materiale

organico ed inorganico, si può considerare anche di effettuare entrambe i trattamenti in successione sulla stessa aliquota (prima quello al calore e poi, previo raffreddamento del campione, quello con acido). In alternativa la conservabilità del campione concentrato (stabile per un massimo di 7 gg), permette di eseguire i trattamenti suddetti, quando necessario, anche successivamente alla semina del concentrato tal quale in relazione a quanto si evidenzia a 48-72 di incubazione

- Calore: prendere un'aliquota (es. 1± 0.5 mL) di campione concentrato o diluito e metterlo in una provetta da centrifuga con tappo a vite ed incubare a 50°± 1 °C per 30 ± 2 min.
- Acido: con soluzione tamponata HCl-KCl a pH 2,2 (vedere la composizione nella nota dell'Allegato 2). In tale caso, centrifugare da 1 a 10 ml della sospensione concentrata a 3000±100 g per 30 min. Rimuovere il sopranatante lasciando la metà di quello centrifugato ed aggiungere un ugual volume della soluzione tamponata acida, mescolare bene e lasciare a temperatura ambiente per 5 ± 0,5 min
- Inoculare da 0,1 a 0,5 mL del campione concentrato tal quale trattato (con il calore e/o con acido) e non trattato in una o due piastre di terreno selettivo per *Legionella*[2];
- Incubare a 36±2 °C in aerobiosi, in ambiente umido, con 2,5% di CO_2, oppure in microaerofilia
- Esaminare le piastre, per i primi 4-5 giorni ogni 24 ore. Qualora nel campione ci fosse una elevata presenza di legionelle o di flora contaminante, sarà necessario eseguire sul campione concentrato, diluizioni in base 10 (10^{-1} e 10^{-2} con soluzione Ringer o soluzione Page) eseguire, se necessario, di nuovo i trattamenti come indicato in precedenza, e inoculare di nuovo le diluizioni non trattate e trattate su terreno selettivo
- Eliminare una piastra come negativa solo dopo almeno 10 giorni di incubazione
- Nel caso di presenza di colonie di *Legionella* tipiche (vedi allegato 5 identificazione), per avere una discreta rappresentatività delle colonie presenti in un campione, analizzare 5 colonie[3] per ogni piastra seminata cercando di prelevare quelle che presentano un aspetto diverso. Nel caso di piastre con presenza di colonie tipiche tra 1 e 5 analizzare tutte le colonie
- Si procederà quindi alla identificazione (Allegato 5). Per le conferme, prendere in considerazione tra tutte le piastre seminate (del campione non trattato e trattato con acido e con calore) quella che alla diluizione più bassa presenta un numero di colonie non superiore a 150.
- Si potrà effettuare una valutazione quantitativa (unità formanti colonia/Litro, UFC/L, vedi il presente Allegato par. 6.4) in base al numero di colonie contate per piastra, al numero delle colonie confermate tra quelle sottoposte a conferma ed alla concentrazione effettuata sul

[1]Questi trattamenti hanno una diversa funzione nel recupero delle legionelle da un campione ambientale. Il trattamento con acido ad esempio, spesso consente il recupero di quelle specie di legionelle (e. *Legionella micdadei* e *Legionella anisa)* più sensibili al calore, inoltre l'acidità della soluzione può facilitare la lisi delle amebe e quindi un recupero maggiore di legionelle in esse eventualmente presenti; il trattamento al calore inibisce la crescita di altri batteri resistenti agli antibiotici ed antifungini presenti nei terreni selettivi;

[2]Per limitare quanto più possibile il tempo di attesa dell'esito dell'analisi, si suggerisce di effettuare subito una diluizione 1:10 del solo campione non trattato quando si presume che ci sia un'elevata concentrazione di legionelle ad es. campioni provenienti da impianti non trattati con biocida e correlati con casi di malattia) e del campione trattato con acido e al calore quando si presume che ci sia un elevato livello di contaminazione (ad es. campioni provenienti da torri di raffreddamento o da altri siti contaminati).

[3] In presenza di cluster o di focolai epidemici, al fine di consentire una maggiore attendibilità del confronto genomico tra i ceppi ambientali e quelli di origine umana, si suggerisce di analizzare un numero di colonie ≥5. Inoltre, in questi casi è necessario conservare i ceppi ambientali isolati e inviarli al più presto al Laboratorio Nazionale di Riferimento.

campione originale, tenendo conto anche delle eventuali diluizioni effettuate successivamente

- Per determinare il numero di UFC di *Legionella* presenti nel campione, si deve considerare la piastra del campione non trattato o trattato (acido e/o calore) che presenta il maggior numero di colonie confermate
- Se attraverso le procedure di analisi ed identificazione si ottengono dati di quantificazione prima dei 10 giorni si possono comunicare al committente al fine di consentire le idonee misure di prevenzione e controllo a tutela della salute pubblica. Tali dati saranno indicati come "preliminari" e dovranno essere successivamente confermati.

Concentrazione per filtrazione con posa diretta della membrana sul terreno di coltura

Per i campioni che contengono basse concentrazioni di *Legionella* (ad es. acqua fredda di un impianto idrosanitario o acque della rete municipale, ecc.) si può utilizzare la concentrazione per filtrazione con posa diretta della membrana sul terreno di coltura.

- ✓ Agitare il campione d'acqua manualmente prima della filtrazione
- ✓ Analizzare da 10 a 1000 mL (prendere nota del volume di campione filtrato) del campione d'acqua
- ✓ Dividere il campione in due aliquote di pari volume e filtrare. Una di esse sarà trattata con acido l'altra no
- ✓ Effettuare il trattamento con acido, direttamente sul filtro con 30±5 mL di soluzione acida (vedi nota Allegato 2) lasciando agire per 5 minuti
- ✓ Eliminare l'acido per filtrazione e lavare la membrana con 20±5 mL di soluzione PAGE o un altro tampone corrispondente
- ✓ Rimuovere con cautela la membrana dal supporto con pinzette sterili e porla (a testa in su) direttamente sul terreno di coltura BCYE o GVPC o MWY assicurando che nessuna bolla d'aria sia intrappolata sotto
- ✓ Trattare l'altra parte di campione allo stesso modo senza aggiunta di acido
- ✓ Incubare a 36±2°C in aerobiosi, in ambiente umido, con 2.5% di CO2, oppure in microaerofilia
- ✓ Esaminare le piastre ogni 2-4 giorni per un periodo di 10 giorni

Nel caso di presenza di colonie di *Legionella* tipiche per avere una discreta rappresentatività delle colonie presenti in un campione, analizzare 5 colonie[3] cercando di prelevare quelle che presentano un aspetto diverso. In caso di piastre con presenza tra 1 e 5 colonie tipiche di *Legionella* per avere una discreta rappresentatività delle colonie presenti in un campione analizzare tutte le colonie. Si procederà quindi alla identificazione (Allegato 5).

Nota Bene.

La filtrazione di grandi volumi di campione può portare ad un arricchimento di sostanze tossiche sulla membrana filtrante. Una diminuzione, ovvero un basso recupero di legionelle con volumi crescenti possono indicare la presenza di sostanze inibenti.

Le colonie di *Legionella* che crescono su una membrana filtrante crescono più lentamente e usualmente hanno dimensioni più piccole delle colonie che crescono sulla superficie dell'agar. Specie di *Legionella non pneumophila* possono non crescere su membrana.

Concentrazione per centrifugazione

In alternativa è possibile utilizzare la concentrazione per centrifugazione. Questo metodo tuttavia è sconsigliato a causa del basso recupero di legionelle ottenuto. Si suggerisce di utilizzarlo solo per campioni difficili da filtrare perché molto torbidi e/o per la presenza di materiale corpuscolare. La centrifugazione viene effettuata con 200±5 ml di campione a 6000 ± 100 g per 10min oppure 3000 ± 100 g per 30min tra 15 e 25 °C. Si elimina sterilmente e molto delicatamente il sopranatante e si risospende il deposito (in 2-20 ml di soluzione Ringer o soluzione Page) o acqua distillata sterile. E' consigliabile rimuovere il sopranatante mediante aspirazione con una pompa da vuoto o con una pipetta sterile, non per decantazione per evitare di perdere le legionelle. Registrare il volume finale, che rappresenta il volume in cui si è concentrato il campione

Procedimento per campioni ambientali a matrice non acquosa

Depositi o sedimenti.

Effettuare diluizioni in base 10 (10^{-1} e 10^{-2}) con acqua distillata sterile soluzione Ringer o Page e agitare bene. Trattare le sospensioni al calore e con acido ed effettuare la semina su terreno selettivo come descritto per le matrici acquose.

Incrostazioni

Frantumare e triturare le incrostazioni in mortaio o mixer sterili. Trattare le sospensioni al calore e con acido ed effettuare la semina su terreno selettivo come descritto per le matrici acquose.

Tamponi

Agitare il tampone nella provetta per rimuovere il materiale raccolto. Trattare le sospensioni al calore e/o con acido ed effettuare la semina su terreno selettivo come descritto per le matrici acquose.

Filtri

Lavare il filtro o parte di esso in acqua distillata sterile o soluzione Ringer o Page. Utilizzare il volume minimo necessario per evitare di diluire il campione. Se si dovesse rendere necessario l'utilizzo di volumi maggiori ai 20 mL effettuare una centrifugazione a 6000± 100 g per 10 min oppure 3000 ± 100 g per 30min tra 15 e 25 °C. Si elimina sterilmente il sopranatante e si risospende il deposito (in 2-20 ml di soluzione Ringer o soluzione Page). E' consigliabile rimuovere molto delicatamente il sopranatante mediante aspirazione con una pompa da vuoto o con una pipetta sterile, non per decantazione per evitare di perdere le legionelle.

Trattare le sospensioni sia al calore che con acido ed effettuare la semina su terreno selettivo come descritto per le matrici acquose.

La presenza massiccia di flora interferente (es. funghi) anche dopo entrambi i trattamenti (calore e acido) non sempre permette di verificare concretamente l'eventuale presenza di

Legionella nella piastra di semina con il rischio di falsi negativi, pertanto il ricorso a tale tipologia di analisi potrebbe non essere significativo.
Tutte le matrici ambientali sopra indicate possono essere conservate a +5 ± 3°C per 7 giorni

Espressione dei risultati

Campioni ambientali a matrice acquosa

Filtrazione con membrana con procedura di lavaggio o con procedura di centrifugazione

In merito alla conferma delle colonie e al successivo calcolo, per quanto riguarda *Legionella* la diluizione viene effettuata solo per avere in piastra un numero contabile di colonie (≤ 150), ed è possibile tenere in considerazione, tra tutte le piastre seminate, (tal quale, trattamento acido, calore), solo quella che alla diluizione più bassa presenta un numero di colonie ≤ 150. Al fine di soddisfare la necessità del confronto con il riferimento normativo anche per i piccoli numeri (< 10 colonie), calcolare il numero delle UFC di *Legionella* presenti in 1 litro (UFC/L) in base al numero delle colonie contate sulla piastra considerata, al numero delle colonie confermate tra quelle sottoposte a conferma, al volume filtrato,

Calcolare il numero delle unità formanti colonia di *Legionella* presenti in 1 litro (UFC/1000 mL) in base al numero delle colonie contate sulla piastra considerata, al numero delle colonie confermate tra quelle sottoposte a conferma, alla diluizione eventualmente effettuata sul campione e al fattore di concentrazione secondo la seguente formula:

$$C_S = \frac{k \times z \times V_S}{n \times V_t \times d} \times \frac{1}{c}$$

dove:

Cs = numero totale dei microrganismi confermati nel volume di riferimento del campione Vs (1000 mL);
k = numero di colonie confermate tra quelle sottoposte a conferma (n);
n = numero di colonie tipiche sottoposte a conferma;
z = numero di colonie tipiche contate sulla membrana;
Vt =volume di campione o della diluizione inoculato su piastra (in mL);
Vs = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (1000 mL);
d = diluizione utilizzata;
c = fattore di concentrazione (es. 1000 mL concentrati in 10 mL fattore di concentrazione = 100).

Arrotondare all'intero i valori ottenuti: se la prima cifra dopo la virgola è minore di 5, non modificare quella precedente; se la prima cifra dopo la virgola è maggiore o uguale a 5, aumentare la cifra precedente di una unità.

Esprimere i risultati preferibilmente con un numero compreso tra 1,0 e 9,9 moltiplicato per l'appropriato esponente in base 10 o l'intero numero con due cifre significative.

L'assenza di Legionella sarà riportata come <100 UFC/L se il volume esaminato è un litro, il volume di concentrato è 10 mL ed il volume dell'inoculo è 0,1 mL. Tale limite soddisfa i requisiti richiesti dalle finalità di prevenzione sanitaria indicate nei documenti di riferimento

dove la concentrazione di 100 UFC/L è la soglia al di sotto della quale non è necessario alcun intervento.

Volumi diversi indicheranno limiti di quantificazione diversi.

Filtrazione con posa diretta della membrana sul terreno di coltura

Tra tutte le piastre in coltura con numero di colonie ≤ 100, selezionare per il conteggio quella che al minor volume filtrato presenta il maggior numero di colonie ascrivibili a *Legionella.*

Eseguire il conteggio solo su piastre che presentano un numero di colonie caratteristiche non superiore a 100 UFC. Al fine di soddisfare la necessità del confronto con il riferimento normativo anche per i piccoli numeri (< 10 colonie), calcolare il numero delle unità formanti colonia di Legionella presenti in 1 litro (UFC/L) in base al numero delle colonie contate sulla piastra considerata, al numero delle colonie confermate tra quelle sottoposte a conferma, al volume filtrato, secondo la seguente formula:

$$C_S = \frac{k \times z \times V_S}{n \times V_t}$$

Cs = numero totale dei microrganismi confermati nel volume di riferimento del campione Vs (1000 mL)
k = numero di colonie confermate tra quelle sottoposte a conferma (n);
n = numero di colonie tipiche sottoposte a conferma;
z = numero di colonie tipiche contate sulla membrana;
Vt = volume di campione saggiato (in mL);
Vs = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (1000 mL).

Se in tutte le piastre seminate non vengono riscontrate colonie ovvero non vengono confermate le eventuali colonie caratteristiche (sospette), esprimere il risultato come riportato nella tabella seguente:

Volume filtrato (mL)	Risultato in UFC/L
≥ 1000	< 1
< 1000 ÷≥ 100	<10
< 100 ÷≥ 10	<100

Incertezza di misura

Normalmente al risultato non viene associata l'incertezza di misura in quanto non significativa ai fini del confronto con i limiti di intervento indicati nel presente documento.
Nel caso in cui fosse richiesta, la norma di riferimento è la ISO 29201 (15.01.2012) "*Water quality- The variability of test results and the uncertainty of measurement of microbiological enumeration methods* .

Volumi d'acqua inferiori ad un litro.

Quando non è possibile avere un campione d'acqua di un litro (es. campionamenti effettuati nelle UTA o nei circuiti di riuniti odontoiatrici, ecc.) esprimere il risultato indicando le UFC/volume campionato.

Campioni ambientali a matrice non acquosa (depositi, sedimenti, incrostazioni, tamponi e filtri)

L'espressione dei risultati in questo caso sarà qualitativa: presenza o assenza oppure rilevata/non rilevata nella matrice esaminata**.**

Campioni di bioaerosol

Per quanto riguarda i campioni d'aria poiché non esistono sufficienti dati nella letteratura scientifica internazionale, che comprovino l'affidabilità del campionamento della matrice bioaerosol per la ricerca di *Legionella*, questo metodo non può essere applicabile per la ricerca quantitativa di tale microrganismo. Infatti:

a. Non esistono studi sulle fonti da campionare né sulle modalità del campionamento, ovvero la distanza dalla fonte, la quantità di bioaerosol e il sistema da utilizzare per campionare, che potrebbero dare un maggiore un recupero. Infatti, applicando il metodo di impatto su agar o su filtro si potrebbero avere dei falsi negativi a causa dell'essiccamento e stress delle legionelle. L'interferenza sull'esito analitico si potrebbe avere anche a causa dell'impossibilità di trattare il campione con il calore o con soluzione acida, per eliminare flora microbica interferente (lieviti, funghi o altri batteri), come avviene per la matrice acquosa e/o solida (sedimenti, depositi, ecc.).
b. Pur esistendo dei campionatori che "impattano" su liquido (soluzione Page o terreno di coltura) in grado di consentire il trattamento del campione, e che dovrebbero pertanto essere utilizzati per bioaerosol potenzialmente contenente *Legionella*, ad oggi la scarsità di studi sulla modalità di campionamento e la mancanza di protocolli di validazione dei sistemi di campionamento sopradescritti non consentono di valutare e garantire l'affidabilità del metodo descritto al punto a).

.

ALLEGATO 5: IDENTIFICAZIONE E CONSERVAZIONE DI LEGIONELLA

Misure di sicurezza

Legionella è un microrganismo appartenente al gruppo 2 di rischio come indicato nel Titolo X del D.Lgs n. 81/2008 e successive modifiche e integrazioni (s.m.i.).

I campioni in cui essa può essere presente, devono essere maneggiati da personale esperto che opera con appropriati dispositivi di protezione individuale (maschere, guanti, occhiali, vedi caratteristiche nel paragrafo DPI del capitolo "Rischio di esposizione professionale"), in laboratori adeguatamente attrezzati e dotati di cappe Biohazard di classe II con certificazione di conformità alla norma tecnica EN 12469 (D.Lgs 81/2008 e s.m.i., Linee guida recanti indicazioni ai laboratori con attività di diagnosi microbiologica e controllo ambientale della legionellosi G.U. N. 29 del 5 febbraio 2005).

In aggiunta alla protezione individuale l'operatore, durante l'esecuzione della prova, deve prestare la massima attenzione a mantenere le condizioni di sterilità del campione eliminando qualsiasi possibilità di contaminazione con eventuali altri campioni o con l'ambiente circostante.

Strumenti, reagenti e Terreni

- ✓ Cappa a flusso laminare Biohazard di classe 2
- ✓ Lampada UV a lunghezza d'onda di 366 ± 20 nm
- ✓ Stereomicroscopio a luce laterale con obiettivo ingrandimento 30x
- ✓ Microscopio a fluorescenza con obiettivi 25x e 50x
- ✓ Termostato regolabile alla temperatura di 36±2°C in cui alla base è stata posta una vaschetta con acqua distillata sterile (rimboccata periodicamente quando si osserva scendere il livello) per garantire l'umidità. La presenza di CO_2 al 2,5% è utile per la crescita di alcune legionelle, ma non è essenziale
- ✓ Piastre BCYE agar con e senza L-cisteina (per la preparazione vedi norma ISO di riferimento 11731)
- ✓ Anticorpi monoclonali contro *Legionella pneumophila* coniugati con fluoresceina-isotiocianato (FITC) per eseguire immunofluorescenza diretta
- ✓ Reagenti per agglutinazione al lattice in grado di riconoscere i sierogruppi di *Legionella pneumophila* (1-15) e altre specie
- ✓ Reagenti per agglutinazione diretta o altri reagenti (ad es. test immunocromatografici);
- ✓ Anticorpi monoclonali o policlonali per il riconoscimento dei singoli sierogruppi o delle singole specie mediante immunofluorescenza indiretta o diretta
- ✓ Anse sterili di plastica 10 e 0,1 µL
- ✓ Provette per congelamento tipo "Microbank"
- ✓ Provette per criogenia per la conservazione dei ceppi
- ✓ Provette contenenti agar BCYE per la subcoltura dei ceppi da congelare
- ✓ Latte parzialmente scremato sterilizzato a115 ±1 °C per 15 minuti
- ✓ Congelatore a -70±10 o -20± 5°C.

Una volta ottenuta la crescita di colonie a seguito di un'analisi di un campione per la ricerca di *Legionella*, sia esso di origine umana che ambientale, si procederà alla identificazione ed eventuale conservazione.

La conservazione avverrà per tutti i ceppi isolati da campioni biologici che verranno spediti al Laboratorio Nazionale di Riferimento che mantiene una collezione di ceppi di *Legionella* sin dal loro primo isolamento nel nostro Paese ed effettua un monitoraggio della loro distribuzione nel territorio italiano attraverso la tipizzazione molecolare.

I ceppi di origine ambientale che dovranno essere conservati ed inviati al Laboratorio Nazionale di Riferimento saranno di preferenza quelli correlati con cluster o epidemie sia di origine comunitaria che nosocomiale, al fine di consentire l'identificazione della fonte dell'infezione attraverso il confronto con il ceppo isolato dai casi di malattia, avvenuti sia in pazienti italiani che stranieri (al ritorno nel loro Paese). Altri ceppi di particolare interesse (ad esempio quando nella scheda di sorveglianza il paziente riferisce il contatto con un ambiente particolare o mai documentato), potranno essere inviati allo stesso Laboratorio Nazionale di Riferimento.

Le prove biochimiche possono aiutare solo relativamente l'identificazione.

Infatti, *Legionella* non fermenta gli zuccheri e solo alcune prove enzimatiche sono presenti in una o più specie.

Le colonie compaiono mediamente dopo un periodo da 3 a 10 giorni di incubazione, con aspetto piccolo, di colore bianco-grigio, leggermente convesse, con bordi "a vetro smerigliato" se osservate con uno stereomicroscopio con luce incidente obliqua ad un ingrandimento di almeno 30x.

Su terreno (MWY) contenente coloranti quali ad esempio il blu di bromotimolo e porpora di bromocresolo alcune specie possono assumere una colorazione caratteristica secondo la specie stessa. Se osservate sotto raggi UV a lunghezza d'onda di 366 nm, alcune specie (*L. bozemanii, L. gormanii, L.dumoffi, L. anisa, L.cherrii, L.steigherwaltii, L.gratiana, L. tucsonensis e L. parisiensis)* mostrano un'autofluorescenza bianco-blu oppure rossastra (*L. rubrilucens e L. erytra).*

Prova differenziale preliminare.

Effettuare subcolture di ogni colonia tipica sia su BCYE agar sia su BCYE agar senza L-cisteina o su comune terreno di coltura; è preferibile Yeast extract agar, Mac Conkey, ecc. in quanto l'agar sangue può promuovere una piccola crescita iniziale dovuta a tracce di sostanze che possono supplire alle necessità del microrganismo. Incubare a 36±2°C per 48 ore.

Le colonie di *Legionella* presenteranno crescita su BCYE agar e assenza di crescita su BCYE agar senza L-cisteina o sul terreno di crescita per germi comuni, per l'incapacità di *Legionella* di moltiplicarsi in assenza di L-cisteina. *L. oakdrigensis e L. spiritensis* richiedono L-cisteina e ferro per l'isolamento primario, ma possono crescere debolmente anche in terreno privo di L-cisteina. Pertanto deve essere accuratamente osservata la differenza di crescita nel terreno con e senza cisteina.

Questa identificazione presuntiva deve essere confermata attraverso l'utilizzazione di reagenti specifici (vedi paragrafo sottostante) oppure attraverso l'amplificazione e il sequenziamento di geni (*mip, rDNA).*

Identificazione definitiva.

L'identificazione della specie e del sierogruppo si effettua su base antigenica con test sierologici che utilizzano anticorpi policlonali o preferibilmente monoclonali.

In caso di negatività con il test di agglutinazione al lattice procedere con il test immunocromatografico che rileva la maggior parte delle specie di *Legionella* e sierogruppi di *Legionella pneumophila* (Helbig et al., 2006) oppure con qualsiasi altro metodo (immunofluorescenza diretta o indiretta, agglutinazione diretta) che consenta di confermare o escludere la presenza di *Legionella*. Tutti questi reagenti sono disponibili in commercio.

L'identificazione di *Legionella* è normalmente eseguita mediante i comuni test di identificazione sopra indicati. Tuttavia, qualora l'esame colturale determini l'isolamento di colonie considerate presunte legionelle, e mediante i test convenzionali non è possibile arrivare ad una identificazione definitiva, si può effettuare attraverso saggi di biologia molecolare. Tali metodiche devono essere svolte in locali del laboratorio opportunamente dedicati e da personale adeguatamente addestrato. L'identificazione può essere eseguita mediante analisi della sequenza del gene *mip,* utilizzando il DNA batterico purificato dalla colonia isolata. Il protocollo utilizzato a questo scopo è stato elaborato e standardizzato dal gruppo di lavoro europeo (ESGLI) e le sequenze ottenute saranno confrontabili con quelle disponibili nel database a questo dedicato (http://www.hpa.org.uk/cfi/bioinformatics/dbases.htm#EWGLI) e risalire alla specie di *Legionella* in esame (Fry et al., 2007; Ratcliff et al., 1998). Nella nota in fondo alla pagina si riporta un breve protocollo.

Inoltre l'identificazione di colonie presunte può essere anche effettuata attraverso saggi di PCR, convenzionale o Real Time, che potranno essere eseguiti utilizzando sistemi in "house" o kit commerciali, purché conformi alla ISO 12869 (2012).

Nei casi in cui sia stata riscontrata un'elevata contaminazione ambientale da colonie presunte essere *Legionella* o tali colonie siano state isolate da campioni umani e ci sia l'impossibilità da parte del laboratorio che ha effettuato le analisi di proseguire alla identificazione definitiva, le colonie isolate possono essere inviate al Laboratorio Nazionale di Riferimento.

I ceppi possono essere sottoposti anche a tipizzazione che può essere effettuata su base fenotipica o genomica. La tipizzazione fenotipica individua il sottotipo monoclonale (si usa soprattutto per tipizzare *Legionella pneumophila* sierogruppo 1) di diversi tipi antigenici esistenti. La tipizzazione genomica può essere effettuata mediante amplificazione basata su sequenza (SequenceBased Typing) che individua la sequenza di 7 geni di *Legionella* (http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php), o attraverso l'analisi del profilo genomico mediante Amplified Fragment Length Polimorphism (AFLP) o Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Queste analisi utilizzate soprattutto per il confronto di stipiti di origine umana ed ambientale e per studi epidemiologici, possono essere effettuate da laboratori che posseggono un'adeguata competenza in queste metodiche oppure dal Laboratorio Nazionale di Riferimento.

Congelamento e conservazione dei ceppi

Per il congelamento il ceppo deve essere coltivato in confluenza per 3 giorni su una provetta a becco di clarino oppure in una piastra contenente BCYE agar (si può utilizzare metà della piastra per un ceppo e metà per un altro, facendo molta attenzione ad evitare cross-contaminazione).

Per conservare i ceppi si possono utilizzare provette appositamente dedicate al congelamento dei batteri distribuite in commercio indicate come "Microbank" in cui è contenuto terreno e delle perline porose alle quali i batteri aderiscono. Le modalità di congelamento sono indicate dal produttore.

In alternativa si utilizzano provette per criogenia da 2 ml in cui viene dispensato (1,5 mL circa) di latte fresco parzialmente scremato sterilizzato in un contenitore di vetro a 115°±1 °C per 15 minuti. Il latte sterilizzato può essere dispensato in contenitori di vetro da 5-10 mL, congelato a -20°C e scongelato al momento d'uso. Il latte scongelato, mantenuto sterile, si può conservare a + 4°±1°C per una settimana.

I batteri vengono raccolti dalla piastra facendoli aderire all'ansa da 10µL e stemperando quelli adesi direttamente nella provetta dove abbiamo distribuito il latte.

I ceppi si congelano a -70±10 (a tempo indeterminato) oppure in alternativa -20± 5° (la durata della vitalità in questo caso è più limitata).

Nota: Protocollo per l'identificazione basata su sequenza utilizzando l'amplificazione del gene *mip*

1. Estrarre il DNA genomico utilizzando un kit commerciale
2. Preparare la reazione di PCR in un volume finale di 50 □L, aggiungendo: 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mMKCl, 200µM di ciascun desossinucleotide, 20 pmol di ciascun primer (1. ForwardLegmip_f: 5'-GGG (AG)AT T(ACG)T TTATGA AGA TGA (AG)A(CT) TGG; 2. Reverse Legmip_r: 5'-TC(AG) TT(ATCG) GG(ATG) CC(ATG) AT(ATCG)GG(ATCG) CC(ATG) CC; e 2.5 U Taqpolymerase. Infine aggiungere il DNA genomico (10-100 ng).
3. Settare il termocycler con i seguenti cicli: pre-denaturazione per 3 min a 96° C (1 ciclo); 35 cicli di 1 min a 94°C (denaturazione), 2 min a 58°C (annealing), 2 min a 72°C (estensione); 1 ciclo di 5 min a 72°C (estensione finale).
4. Verificare l'amplificazione sottoponendo a separazione elettroforetica su gel 2% agarosio 5 µL della reazione.
5. Purificare il prodotto di PCR mediante colonnine di purificazione per PCR, commercialmente disponibili.
6. Determinare la sequenza nucleotidica o mediante la strumentazione presente in laboratorio o attraverso servizi esterni.
7. Il dato grezzo di sequenza sarà analizzato mediante software online al link http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/cgi-bin/legionella/mip/mip_id.cgi.Determinare la specie di *Legionella* mediante click su "close match alignment".

ALLEGATO 6:RICERCA DI LEGIONELLA IN CAMPIONI AMBIENTALI MEDIANTE REAL-TIME PCR

Il presente allegato riporta indicazioni per la determinazione della presenza di DNA di *Legionella* in campioni di acqua. Per approfondimenti e ulteriori dettagli si suggerisce la consultazione della norma di riferimento da cui è tratto, *"Water quality-Detection and quantification of Legionellaspp and/or Legionella pneumophila by concentration and genicamplification by quantitativepolymerasechainreaction (qPCR)"* (ISO /TS 12869, 2012).

Quanto riportato ha lo scopo di suggerire una buona pratica di laboratorio per l'attuazione della Real Time PCR, poiché al momento non esiste una procedura standard e la metodica rimane ancora oggi non validata per scopi diagnostici. Il presente allegato è rivolto a coloro che intendano determinare e quantificare *Legionella spp* e/o *Legionella pneumophila*, mediante amplificazione genica attraverso Real Time PCR. Essa può essere utilizzata per una rapida analisi di routine, ma soprattutto in campioni ambientali correlati a focolai epidemici, per i quali è ancor più necessaria la tempestività delle indagini, al fine di attuare le opportune misure di controllo per il contenimento dei casi di malattia.

Aspetti generali

Lo staff tecnico preposto alle analisi di campioni d'acqua mediante Real Time PCRdeve conoscere i fondamenti della biologia molecolare ed in particolare della PCR, nonché deve avere appropriate conoscenze di microbiologia. Se la stessa persona esegue le analisi colturali e molecolari, essa deve indossare un differente camice per le due diverse analisi. In particolare, durante la fase di preparazione della Real Time PCRdeve sempre indossare i guanti utilizzare materiale monouso idoneo per al metodo Real Time PCRed avere a disposizione un set di micropipette per la Real Time PCRben distinto da quello usato per l'esame colturale.

Aree di lavoro

Il laboratorio deve avere idealmente 3 aree di lavoro fisicamente distinte:
1. Area per la concentrazione dei campioni e l'estrazione del DNA
2. Area per la preparazione della miscela di reazione della Real Time PCR;
3. Area per l'amplificazione

Campionamento

I campioni devono essere raccolti in contenitori sterili, con tutte le precauzioni necessarie. Sul contenitore e/o su un registro devono essere indicati: luogo e data del prelievo, volume e temperatura e se è stato effettuato un trattamento con biocidi. Nel caso in cui si utilizzi la Real Time PCR per analisi di routine, se si prevede che il/i campioni siano negativi, è possibile campionare un solo litro. Nel caso in cui si debbano investigare cluster epidemici è sempre consigliato il prelievo di 2 litri d'acqua che saranno utilizzati possibilmente mescolati in sospensione omogenea. Qualora non fosse possibile fare un'unica sospensione, analizzare una

prima metà di ciascun litro con la Real Time PCR ed eventualmente (se positivo in Real Time PCR) la seconda metà mediante coltura. Nel caso in cui un diverso volume d'acqua è prelevato, bisogna indicarlo e tenerne conto nell'analisi quantitativa.

I campioni devono essere analizzati immediatamente o entro 24 h dal prelievo. In questo caso, i campioni devono essere conservati a 5 ± 3 °C.

Concentrazione

Quando la concentrazione è ottenuta mediante filtrazione, i filtri devono essere in policarbonato o altro componente con bassa capacità di adsorbimento di proteine o DNA. Non si possono usare filtri in cellulosa. I filtri devono avere porosità 0.45µm

E' preferibile non conservare i filtri a 5 ± 3 °C, bensì procedere subito con l'estrazione del DNA genomico.

Decontaminazione

Tutti i dispositivi ed il materiale riciclabile devono essere trattati per immersione o ammollo con una soluzione di ipoclorito (1,7% di cloro attivo) o acido cloridrico (1%) o detergente non ionico per almeno 30 minuti, seguito da risciacquo per due/tre volte con acqua distillata filtrata e sterilizzata a 121±1°C per 20 min. La radiazione ultravioletta può essere utilizzata per decontaminare strumentazione di piccole dimensioni o parti di essa (micropipette, pinzette, porta-filtro delle rampe di filtrazione, ecc).

Estrazione di DNA genomico

L'estrazione del DNA genomico consiste nella lisi dei batteri e successiva purificazione dalle altre componenti batteriche, in particolare da quelle sostanze che potrebbero inibire la reazione di Real Time PCR. Pertanto, la scelta del metodo di estrazione-purificazione deve essere fatta sulla base della migliore soluzione per la successiva fase di amplificazione. Ciò significa che sarebbe opportuno valutare i metodi di estrazione, mediante prove preliminari su campioni test. E' dimostrato che i metodi di estrazione che fanno uso di sistemi automatizzati danno i migliori risultati in Real Time PCR. Si possono, comunque, valutare metodi che si basano su matrici di silice o su lisi alcalina seguita da purificazione con resine su colonna.

Il DNA può essere estratto o direttamente sul filtro o dopo completa rimozione dei batteri da esso, per es. mediante sonicazione. Ciascuna estrazione di DNA deve prevedere un controllo negativo, che assicuri l'assenza di cross-contaminazioni. Il DNA estratto può essere conservato a 5 ± 3 °C, se analizzato in giornata, oppure conservato a -20°C per alcuni mesi.

Controllo di inibizione

Molti kit presenti in commercio per la determinazione e quantificazione di *Legionella*, includono un controllo interno di inibizione, utile per accertare i campioni negativi. Nel caso in cui un DNA controllo interno venga aggiunto alla miscela di reazione di Real Time PCR, questo potrà essere rappresentato o da DNA genomico di *Legionella* o da un gene inserito in un plasmide e amplificato dagli stessi primers del gene target. La concentrazione di questo DNA

dovrebbe corrispondere alle sospensioni dei DNA genomico di *L. pneumophila* usati come standard. Anche in questo caso bisogna fare test di calibrazione, utilizzando diluizioni in base 10 di una soluzione contenente DNA (plasmidico, genomico o oligonucleotidi) a concentrazione nota.

Amplificazione di DNA mediante qPCR

Esistono vari kit disponibili in commercio per la determinazione e quantificazione di *Legionella* in campioni d'acqua, per i quali resta valido quanto indicato fino ad ora. Inoltre, numerosi studi sono stati pubblicati che valutano sistemi "in house" anch'essi basati su qPCR, che possono essere presi ad esempio per l'analisi di campioni d'acqua (Joly et al., 2006b; Morio et al., 2008).

Valutazione di sistemi "in house": aspetti generali

La qPCR è un metodo che si basa sull'amplificazione di un gene target, evidenziata da una sonda, marcata con un fluoroforo, che ibridizza con una regione dell'amplificato. Quando si sviluppa un test di qPCR occorre innanzitutto ottimizzare i parametri di amplificazione (numero di cicli, temperature di ibridazione, concentrazione di $MgCl_2$, ecc.) e la composizione della miscela di reazione (dNTPs, primers, sonda, ecc.). Quindi, bisogna valutare la sensibilità (utilizzando delle diluizioni del DNA genomico standard a più bassa concentrazione) e la specificità del sistema. Nel determinare la specificità dovranno essere eseguiti test di inclusività, su tutti i sierogruppi di *L. pneumophila* e su *L. spp*, e di esclusività su una lista di patogeni appartenenti ad altre specie (*"Water quality-Detection and quantification of Legionellaspp and/or Legionella pneumophila by concentration and genicamplification by quantitativepolymerasechainreaction (qPCR)"* (ISO /TS 12869, 2012).

Per le analisi preliminari e per tutte quelle successive, è bene preparare soluzioni stock di: DNA standard, primers, sonde, controllo interno di inibizione. Le soluzioni stock vengono poi diluite alle concentrazioni di lavoro. Soluzioni stock e soluzioni di lavoro devono essere conservate a -20°C. La miscela di reazione deve essere preparata al momento.

Rilevazione quantitativa

La rilevazione è ottenuta mediante ampliconi specifici del genere *Legionella* e/o specifici della specie *L. pneumophila*. Qualora si voglia determinare la quantità di DNA di *Legionella* presente nel campione, sono necessari almeno quattro campioni di DNA genomico di *L. pneumophila* ceppo ATCC 33152 a concentrazione nota espresso in unità genomiche (UG), un controllo interno di inibizione, per verificare qualche inibizione presente nel DNA estratto dal campione, un controllo negativo. Tutti i campioni, DNA standard, controlli negativi e campioni test) devono essere analizzati almeno in doppio.

Le concentrazioni sono espresse in unità genomiche per litro (UG/L) di campione. Se un volume differente è stato utilizzato nella fase di concentrazione, si dovrà tenere conto del volume filtrato. Se un campione è parzialmente o totalmente inibito, l'analisi deve essere ripetuta diluendo il campione fino ad ottenere la rilevazione attesa per il controllo interno di inibizione.

Per verificare la capacità di quantificazione nel sistema utilizzato è consigliabile l'uso periodico di DNA di riferimento a titolo noto e certificato.

Per l'analisi dei campioni mediante qPCR è raccomandato l'uso di kit commerciali, che attestino la validazione secondo la norma ISO/TS 12869 sopra riportata o AFNOR NF T90-471 'Qualité de l'eau - Détection et quantification des *Legionella* et/ou *Legionella pneumophila* par concentration et amplification génique par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT – PCR)'.Avril 2010.

N.B. I campioni analizzati mediante Real Time PCR che hanno dato esito negativo **possono non essere analizzati mediante coltura.** In questo caso il risultato verrà espresso come « DNA di *Legionella* non rilevato mediante Real Time PCR ». Al contrario, se i campioni sono positivi per Real Time PCR devono essere analizzati mediante coltura ed esprimere il risultato come indicato nell'allegato 4.

ALLEGATO 7: REVISIONE CIRCOLARE 400.2/9/5708 DEL 29/12/93

Facendo seguito alle precedenti circolari ministeriali concernenti la sorveglianza dei casi di legionellosi si forniscono indicazioni in merito all'aggiornamento della scheda relativa a detta sorveglianza.

Le modifiche apportate alla scheda sono suggerite dall'esigenza di disporre di dati più mirati, che consentano di individuare più correttamente i fattori di rischio e le eventuali esposizioni dei casi di legionellosi nel nostro Paese.

Di seguito vengono riportate le modifiche apportate alla scheda:

- E' stata aggiunta una voce relativa al trapianto di organo (tale voce è stata ritenuta un'importante informazione, in quanto pazienti sottoposti a trapianto sono a maggior rischio di infezione).
- E' stata tolta la voce relativa al trattamento con antibiotici.
- E' stata ampliata la voce relativa al ricovero ospedaliero con la richiesta di specificare la diagnosi di ammissione.
- E' stata aggiunta la voce cure termali.

La scheda modificata, di seguito riportata, sostituisce la precedente allegata alle Linee guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi. Gazzetta Ufficiale n. 103 del 05/05/2000 e dovrà essere utilizzata per la segnalazione dei casi di legionellosi.

ALLEGATO 8: ELENCO DEI LABORATORI REGIONALI DI RIFERIMENTO PER LA LEGIONELLOSI

A. Laboratori di riferimento per la diagnosi ambientale

ABRUZZO
ARTA ABRUZZO
Dott.ssa G. Vespa
Via Nizza15, 67100 l'Aquila
Tel : 0862 579703
Fax: 0862579729
g.vespa@artaabruzzo.it

BASILICATA
ARPA BASILICATA
Dott.ssa L.Galella
Via della Fisica18, 85100 Potenza
Tel:0971 656294
Fax:0971656204
e-mail: luciana.galella@arpab.it

CALABRIA
Azienda Ospedaliera Mater Domini
Policlinico Universitario
Prof. A.Focà
Via T. Campanella115, 88100 Catanzaro
Tel: 0961 712427
Fax: 0961770403
e-mail: afoca@unicz.it

CAMPANIA
ARPA Campania
Dipartimento Tecnico Provinciale di Salerno
Dott.ssa A.M. Rossi
Via G. Lanzalone 54, 84100 Salerno
Tel: 0892758099
Fax: 0892758090
Cell: 3498571140
e-mail: am.rossi@arpacampania.it

EMILIA ROMAGNA
Laboratorio Integrato Sezione Provinciale di Bologna
Dr.ssa M.A. Bucci Sabattini
Dr.ssa Leonarda Chetti
Via Trachini, 17 – Via F. Rocchi, 19
40138 Bologna
Tel: 051 396211

Fax: 051 342642
mbucci@arpa.emr.it
chetti@arpa.emr.it

Laboratorio Integrato Sezione Provinciale di Reggio Emilia
Dr.ssa Loretta Venturi
T.d.P. Milena Cavalchi
Via Amendola 2, 42122 Reggio Emilia
Tel: 0522336011
Fax: 0522330546
lventuri@arpa.emr.it
mcavalchi@arpa.emr.it

FRIULI VENEZIA GIULIA
ARPA Friuli Venezia Giulia
Dr.ssa Franchi Mariella
Dipartimento Provinciale di Udine
Via Colugna 42, Udine
Tel: 0432-493755
Fax: 0432-493711
e-mail: marinella.franchi@arpa.fvg.it

LAZIO
ARPA LazioSez. Latina
Dott.ssa Paola Pagliarella
Via A. Serpieri 3, 04100 Latina
Tel: 0773/402920
Fax:0773/402929
e-mail: paola.pagliarella@arpalazio.it

ARPA Lazio Sez. Roma
Dott. M. Giacomelli
Via Saredo52, 00173 Roma
Tel:06 41435673
Fax: 067216007
e-mail: massimo.giacomelli@arpalazio.it

LIGURIA
Università degli Studi di Genova
Dipartimento di Scienze della Salute
Via A. Pastore,1 Genova
Sezione Igiene e Medicina Preventiva
Laboratorio di Epidemiologia e Diagnostica Molecolare degli Agenti Infettivi
Prof. G. Icardi
tel 010 3533001 3538577 fax 010 3538125
e-mail: icardi@unige.it

LOMBARDIA
Laboratorio di Prevenzione ASL di Milano

Dott.ssa M. Foti
Via Juvara, 22- 20129 Milano
Tel 02 85789293-9278-9286
e-mail: mfoti@asl.milano.it
e-mail: svitaliti@asl.milano.it
e-mail: laboratorioprevenzione@asl.milano.it

Laboratorio di Sanità Pubblica ASL Brescia
Dott. F. Speziani
Via cantore 20-25124 Brescia
Tel 030 3838560
e-mail: labsan@aslbrescia.it

MARCHE

ARPAM Marche
Dott.ssa Gabriella Giorgi
Dipartimento Provinciale di Pesaro
Via E. Barsanti 8, 61100 Pesaro
Tel: 0721 3999733
Fax: 0721 3999759
e-mail: gabriella.giorgi@ambiente.marche.it

MOLISE

ARPA Molise
Dipartimento Provinciale di Isernia
Dott.ssa A.M. Mannuppella
Via G. Berta, 86170 Isernia
Tel: 0865-26994
Fax: 0865-414986
e-mail: isernia.dip@arpamolise.it

PIEMONTE

ARPA Piemonte
Dipartimento Provinciale ARPA Novara
Dott.ssa M.V. Stefanetti
Viale Roma7/e, 28100 Novara
Tel: 0321 665795
Fax: 0321613099 -0321665788
e-mail: v.stefanetti@arpa.piemonte.it
e-mail: legionella@arpa.piemonte.it

PROVINCIA AUTONOMA DI BOLZANO

Laboratorio Biologico - A.P.P.A. Bolzano
Dr. Alberta Stenico
Via Sottomonte 2, I-39055 Laives
Tel: 0471 950431
Fax: 0471 951263
e-mail:alberta.stenico@provincia.bz.it

PROVINCIA AUTONOMA DI TRENTO
Laboratorio di Sanità Pubblica
Azienda Prov. per i Servizi Sanitari
Dott. Italo Dell'Eva
Centro Servizi Sanitari – Palazzina C
Viale Verona, 38123 Trento
tel. 0461 902803
e-mail: italo.delleva@apss.it

PUGLIA
Dipartimento di Scienze Biomediche e Oncologia Umana
Sezione di Igiene, Università di Bari
Prof. M.T. Montagna
70124 Bari
Tel: 080 5478476
Fax: 080 5478472
e-mail: montagna@igiene.uniba.it

SARDEGNA
Agenzia Regionale Protezione Ambiente della Sardegna Dipartimento di Oristano
Dott. G. Frau
Viale Diaz 63, 09170 Oristano
Tel +39 0783 770607
Fax+39 0783 73750
e-mail: gfrau@arpa.sardegna.it

SICILIA
Dipartimento di Igiene, Medicina Preventiva e Sanità Pubblica
Azienda Policlinico Universitario di Messina, Torre Biologica, 3° piano
Prof. S. Delia
Via Consolare Valeria, 98125 Messina
Tel: 0902212444-2213353
Fax: 0902213351
e-mail: adelia@unime.it

Dipartimento "G.F. Ingrassia" Igiene e Sanità Pubblica
Azienda Ospedaliera Università di Catania
Prof.ssa M.A. Coniglio
Via Santa Sofia 87, 95123 Catania
Tel: 0953782069-087-175
Fax: 095 3782188
Cell.3407063211
e-mail: ma.coniglio@unict.it

Dipartimento di Diagnostica di Laboratorio
Azienda Ospedaliera Università di Palermo
Prof.ssa A. Giammanco
Via del Vespro 133, 90127 Palermo
Tel: 091 6553670-3678

e-mail: anna.giammanco@unipa.it

TOSCANA
S.C. Laboratorio di sanità Pubblica Area Vasta Toscana Centro
U.F. Laboratorio di Biotossicologia
dott.ssa Valeria Li Donni
Via di San Salvi 12, 50135 Firenze
Tel: 055 6933843
Fax: 055 6933596
e-mail: valeria.li_donni@asf.toscana.it

UMBRIA
ARPA Umbria
U.O. Laboratorio Multisito Perugia
Sezione Microbiologia Acque
Dott.ssa G. Tozzi
Via Pievaiola Loc. San Sisto, 06132 PERUGIA
Tel: 075 51596515
Fax: 07551596369
e-mail: g.tozzi@arpa.umbria.it

VALLE D'AOSTA
ARPA Valle d' Aosta -Lab. Microbiologia
Dott.ssa M. Francesca Borney
Loc. Grande Charrière 44
11020 Saint Christophe (AOSTA)
Tel: 0165 278543
Fax: 0165 278550
e-mail: f.borney@arpa.vda.it

VENETO
ARPA Veneto
Dipartimento Regionale Laboratori
Servizio Laboratorio di Venezia
Dr.ssa G. Bandettini
Via Lissa, 6
30174 Venezia Mestre
Tel:041 5445650
Fax: 041 5445651
Cell. 349 1530449
e-mail: gbandettini@arpa.veneto.it

B. Laboratori di riferimento per la diagnosi clinica

ABRUZZO
Asl di Teramo
Dipartimento dei Servizi
Direttore Dott. Giuseppe Sciarra

Riferimenti Dott. Vittoria Fabrizi e Dott. Giancarlo Pagano (dirigenti Biologi)
C/0 Presidio Ospedaliero di Teramo
Cir.ne Ragusa 1 64 100 Teramo
0861 429330 giuseppe.sciarra@aslteramo.it

Asl Lanciano-Vasto-Chieti
Servizio di Patologia Clinica Ospedale di Lanciano
Direttore Dott.ssa Maria Golato
339 6851730 maria.golato@asllancianovasto.it

Asl Pescara
Dott.Domenico D'Antonio
Direttore U.O.C. di Microbiologia e Virologia Clinica
Asl Pescara
Via Paolini 45
65100
Pescara
085 4252711 domenico.dantonio@ausl.pe.it

CALABRIA
Azienda Ospedaliera Mater Domini
Unità Operativa di Microbiologia Clinica
Prof. A. Foca
Via T. Campanella, 115- 88100 Catanzaro
Tel: 0961 775071
Fax: 0961 770403
e-mail: afoca@unicz.it

EMILIA ROMAGNA
Azienda Ospedaliero Universitaria di Modena
Laboratorio di Microbiologia e Virologia
Dott. F. Rumpianesi
Via del Pozzo, 71- 41100 Modena
Tel 0594223763
Fax 059 422 3625
e-mail : rumpianesi.fabio@policlinico.mo.it

LAZIO
Azienda Ospedaliera S. Camillo – Forlanini
Piazza C. Forlanini 1, 00151 Roma
f.f. Dott.ssa Elisabetta Ravieli
eravieli:@scamilloforlanini.rm.it
06 58703708/5494/6041

LOMBARDIA
Azienda Ospedaliera Niguarda
Laboratorio di Microbiologia e Virologia
Dott. G. Gesu

Piazza Ospedale Maggiore 3- 20162 Milano
Tel 026444 4858
Tel 026444 3888
microbiologia@ospedaleniguarda.it
giovanni.gesu@ospedaleniguarda.it

MARCHE

Azienda Sanitaria Umberto I
Laboratorio di Analisi Cliniche
Dott.ssa E. Manso
Via Conca Torrette di Ancona- Torrette di Ancona 60020 Ancona
Tel 071 5964284
Fax 071 5964638
e-mail e.manso@ospedaliriuniti.marche.it

PIEMONTE

Dipartimento Medicina di laboratorio SC Microbiologia Virologia U
San Giovanni Battista
Azienda Ospedaliera Città della salute e della Scienza
Prof. ssa R. Cavallo- Dott.ssa A Barbui
Corso Bramante 88/90
10126 Torino
Tel 0116335222
Fax 0116335194
rosanna.cavallo@unito.it
abarbui@cittadellasalute.to.it

Laboratorio Ricerca Speciale Microbiologica
Ospedale Amedeo di Savoia
Dott.ssa L. Franzin
Corso Svizzera 164
10149 Torino
Tel 0114393908
Cell.3339417798
laura.franzin@aslto2.piemonte.it

PROVINCIA AUTONOMA DI BOLZANO

Laboratorio Aziendale di Microbiologia e Virologia
Comprensorio sanitario di Bolzano
Azienda Sanitaria dell'Alto Adige
Dott.ssa E. Pagani
Via Amba Alagi 5
39100 Bolzano
Tel. 0471 909627
Fax. 0471272631
Elisabetta.pagani@asbz.it

PUGLIA

Dip. Scienze Biomediche e Oncologia Umana, Sezione di Igiene
Universita' degli Studi di Bari "Aldo Moro"

Prof. M.T. Montagna
Piazza G. Cesare, 11 - 70124 BARI
Tel 080 5478476
Fax 080 5478472
e-mail: montagna@igiene.uniba.it

SARDEGNA

Azienda Ospedaliera Bortzu
Direzione Sanitaria del Presidio
Dott.ssa C. Crociani, Dott. M. Liguori
Piazzale Ricchi, 1
09134 Cagliari
Tel: 070 539805/070 539804
Fax: 070 539803
e-mail claudiacruciani@aob.it
e-mail marcoliguori@aob.it

Azienda Ospedaliero Universitaria di Sassari
Unità operativa di Igiene e Medicina Preventiva
Prof. I. Mura
Via Padre Manzella, 4
07100 Sassari
Tel: 079 228293
Fax: 079 228472
e-mail igiene@uniss.it

SICILIA

Dipartimento di Igiene, MedicinaPreventiva e SanitàPubblica
PoliclinicoUniversitario, Torre Biologica, 3° piano
Prof. S.A. Delia
Via Consolare Valeria,
98125 Messina
Tel. 090 2212444
Fax 090 2213351
e-mail: adelia@unime-it

VALLE D'AOSTA

S.C. Microbiologia - Azienda Unità Sanitaria Locale
Dott. Piergiorgio Montanera
Tel: 0165 544479
Fax: 0165 544447
Locale Valle d'Aosta
Via Guido Rey, 5- 11100 AOSTA
e-mail:pmontanera@ausl.vda.it

VENETO

Azienda Ospedaliera di Padova
Prof. G. Palù
UO Microbiologia e Virologia
Via Giustiniani 2- 35128 Padova

Tel: 049 8213088
Fax 049 8213054-8211997
Giorgio.palu@uniudipd.it

ALLEGATO 9: MODULO A ELDSNET

European Legionnaires' Disease Surveillance Network

Modulo A

Rapporto da inviare 2 settimane dopo la notifica di cluster

Nome della struttura recettiva:
Città/ Regione:
Nazione:
Data di notifica del cluster da parte dell'ISS __/__/____(*gg/mm/aa)*

Si dichiara che è stato effettuato un sopralluogo presso la struttura recettiva summenzionata e si conferma che:

	SI	NO
E' stata effettuata una valutazione del rischio?	☐	☐
Sono state intraprese misure di controllo?*	☐	☐
La struttura recettiva rimane aperta?	☐	☐

*Se "No", per favore specificare i motivi per cui le misure di controllo non sono state intraprese

_____
_____
_____

Data della valutazione del rischio: __/__/____(*gg/mm/aa)*

Data di invio del modulo all'ISS: __/__/____(*gg/mm/aa)*

Nome della persona che ha compilato il presente modulo:_____

da parte di *(se rilevante)*:_____
Commenti:_____
_____

Per favore inviare via mail a **rota@iss.it** oppure via fax al n. 06 44232444

ALLEGATO 10: MODULO B ELDSNET

EuropeanLegionnaires' Disease Surveillance Network

Modulo B

Rapporto da inviare 6 settimane dopo la notifica di cluster
(N.B. è necessario rispondere a tutte le domande)

Nome della struttura recettiva:_____
Città/ Regione:_____
Data di notifica del cluster da parte dell'ISS __/__/____(*gg/mm/aa*)

Presso la struttura recettiva sopramenzionata è stata condotta un'indagine ambientale e una valutazione del rischio. Sulla base dei risultati dell'indagine, si dichiara che:

	SI	NO	N/A*
E' stato effettuato il campionamento ambientale	☐	☐	☐
Legionella è stata isolata dall'impianto idrico	☐	☐	☐
*se si – specificare specie e sierogruppo:*_____			
Misure preventive erano già in atto prima della notifica del cluster	☐	☐	☐
Misure di controllo intraprese in risposta al cluster	☐	☐	☐
se si, specificare: iperclorazione	☐	☐	☐
shock termico	☐	☐	☐
altro (*specificare*) _____			
Le misure di controllo sono soddisfacenti	☐	☐	☐
Il gestore della struttura è stato informato della necessità di adottare misure preventive a lungo termine	☐	☐	☐
La struttura recettiva rimane aperta	☐	☐	☐
se no – un nuovo rapporto deve essere inviato all'ISS prima della riapertura	☐	☐	☐

Data del presente rapporto __/__/____ (*gg/mm/aa*)

Nome della persona che ha compilato il rapporto:_____

Commenti:_____
_____
_____

Per favore inviare per email a rota@iss.it oppure per fax al n. 06 44232444

ALLEGATO 11: QUESTIONARIO PER L'INDAGINE DI FOCOLAI EPIDEMICI

ALLEGATO 12: LISTA DI CONTROLLO PER IL SOPRALLUOGO DI VALUTAZIONE DEL RISCHIO LEGIONELLOSI

NOTA INTRODUTTIVA - FINALITA' DELL'ALLEGATO 12

La presente lista di controllo è redatta al fine di mettere a disposizione, dell'Organo di Controllo Pubblico, uno strumento di supporto per redigere una sintetica valutazione del rischio legionellosi, in occasione di controlli nei quali si debba verificare la valutazione del rischio legionellosi della struttura oggetto delle attività ispettive.

Tale lista di controllo può anche essere utilizzata, quale base preliminare di stima del rischio, da parte del Responsabile della struttura, in fase d'iniziale azione di prevenzione del Rischio.

Al Responsabile della struttura è comunque richiesta la redazione di una completa ed approfondita valutazione del rischio legionellosi. Pertanto, si sottolinea che l'esecuzione di tale base preliminare di studio (Allegato 12), non sostituisce, per il Responsabile della struttura, la necessità della redazione di una più completa ed approfondita valutazione del rischio legionellosi.

La definizione motivata degli interventi tesi a ridurre e controllare gli eventuali Fattori di Rischio (FR), individuati tramite tale lista di controllo, deve essere sviluppata dal Responsabile della struttura, laddove non già eseguito.

Identificazione Struttura

Tipologia di Struttura
□ Ad uso collettivo □ Industriale □ Nosocomiale □ Recettivo □ Termale □ Altro_____

Ragione sociale_____

Indirizzo_____

Città_____

Tel_____Fax_____E-mail_____

Periodo di esercizio: □ Annuale □ Stagionale da _____a_____

Valutazione del rischio legionellosi effettuata dalla struttura□ Si □ No

Data emissione del più recente Documento di Valutazione del rischio Legionellosi:_____

Notazioni:_____

_____

_____

Piano di Gestione del rischio implementato dalla Struttura Si No

Notazioni:_____
_____
_____

Campionamenti microbiologici di controllo presenza Legionella spp. effettuati Si No

Notazioni:_____
_____
_____
_____

Registro d'Igiene - Manutenzione presente o documentazione equivalente Si No

Notazioni:_____
_____
_____
_____

Monitoraggio Temperature acqua destinata al consumo umano

Identificazione Punto di controllo	***Temperatura acqua calda sanitaria***	***Temperatura acqua fredda sanitaria***	***Concentrazione di disinfettante (se applicato)***	***Condizioni di pulizia diffusori/rompigetto***

Sistema di disinfezione acqua destinata al consumo umano

Presente Si No

Se presente, il disinfettante usato è:_____

Se presente, è disponibile la Scheda di Sicurezza del disinfettante ad indicarne la sua composizione? Si No

Se presente, il dosaggio è Automatico Manuale

Se presente, è stato implementato un sistema di controllo automatico del funzionamento dell'impianto di disinfezione e di monitoraggio in continuo delle concentrazioni del disinfettante? Si No

Notazioni:_____
_____
_____
_____

Impianto d'acqua fredda sanitaria

Se presenti più di un impianto d'acqua fredda sanitaria, tale sezione è da compilare separatamente per ognuno di essi.

Fonte di approvvigionamento dell'acqua all'impianto

 Rete idrica municipale
 Pozzo
 Mista

Materiale/i delle condutture:_____

Se sono presenti serbatoi di raccolta dell'acqua fredda destinata al consumo umano essi sono:
 In muratura PrefabbricatiIn cemento armato

Se prefabbricati essi sono isolati termicamente Si No

Se presenti, il loro collegamento idraulico è In serie In parallelo Non applicabile

Numero serbatoi:_____

Capactà totale: _____

Capacità parziali:_____

Se presenti, è effettuato lo svuotamento e la pulizia almeno annuale dei serbatoi Si No

FR.AF.1) Se lo svuotamento e la pulizia almeno annuale dei serbatoi non è effettuata, essa è compensata da un'azione di controllo alternativa? Si No Non applicabile (se non presenti)

Notazioni
_____
_____
_____

FR.AF.2) ASSENZA di rami morti (linee di distribuzione mai utilizzate) □ Si □ No□ Non applicabile (sono già in atto adeguate misure di compenso di tale fattore di rischio)

Descrivere le misure di compenso, se applicate:_____
_____
_____
_____

FR.AF.3) ASSENZA di linee di distribuzione caratterizzate da limitato utilizzo (indicativamente utilizzate meno di 20 minuti alla settimana) o rallentamento del flusso idrico□ Si □ No□ Non applicabile (sono già in atto adeguate misure di compenso di tale fattore di rischio)

Descrivere le misure di compenso, se applicate:_____
_____
_____
_____

FR.AF.4) ASSENZA di linee di distribuzione esterne o scarsamente/per nulla isolate termicamente
□ Si □ No□ Non applicabile (sono già in atto adeguate misure di compenso di tale fattore di rischio)

Descrivere le misure di compenso, se applicate:_____
_____
_____
_____

FR.AF.5) Il monitoraggio delle temperature ha evidenziato che tutte le temperature d'erogazione dell'acqua fredda sanitaria sono inferiori ai 20°C?□ Si □ No□ Non applicabile (sono già in atto adeguate misure di compenso di tale fattore di rischio)

Descrivere le misure di compenso, se applicate _____
_____
_____

FR.AF.6) Il monitoraggio delle temperature ha evidenziato che la temperatura di stoccaggio dell'acqua fredda sanitaria è inferiore ai 20°C?□ Si □ No □ Non applicabile (se non presenti serbatoi di raccolta dell'acqua fredda sanitaria o se sono già in atto adeguate misure di compenso di tale fattore di rischio)

Notazioni:_____
_____

_____
_____

Lavori di ristrutturazione

Sono state effettuate modifiche nell'impianto idrico negli ultimi 12 mesi? Si No

Descrizione tipologia
d'intervento:_____
_____
_____
_____

Impianto d'acqua calda sanitaria

Se presenti più di un impianto d'acqua calda sanitaria, tale sezione è da compilare separatamente per ognuno di essi.

Fonte di approvvigionamento dell'acqua all'impianto
 Rete idrica municipale
 Pozzo
 Mista

Materiale/i delle
condutture:_____

Presenza di bollitori/serbatoi di raccolta dell'acqua calda sanitaria Si No

Se presenti, essi sono isolati termicamente Si No

Se presenti, più di un bollitore/serbatoio centralizzato di alimentazione per singolo impianto di acqua calda sanitaria, il loro collegamento idraulico è In serie In parallelo Non applicabile

Numero serbatoi:_____

Capacità totale:
_____

Capacità parziali:_____

FR.AC.1) Se presenti bollitori/serbatoi di raccolta dell'acqua calda sanitaria, è effettuato lo spurgo regolare dalla loro valvola di fondo? Si No Non applicabile (se non presenti)

Se presenti bollitori/serbatoi di raccolta dell'acqua calda sanitaria, è effettuata la loro disinfezione almeno semestrale? Si No

FR.AC.2) Se la disinfezione almeno semestrale dei bollitori/serbatoi non è effettuata, essa è compensata da un'adeguata azione di controllo alternativa? □ Si □ No □ Non applicabile (se non presenti)

Notazioni:_____
_____
_____
_____

FR.AC.3) ASSENZA di rami morti (linee di distribuzione mai utilizzate) □ Si □ No□ Non applicabile (sono già in atto adeguate misure di compenso di tale fattore di rischio)

Descrivere le misure di compenso, se applicate:_____
_____
_____
_____

FR.AC.4) ASSENZA di linee di distribuzione caratterizzate da limitato utilizzo (indicativamente utilizzate meno di 20 minuti alla settimana) o rallentamento del flusso idrico□ Si □ No□ Non applicabile (sono già in atto adeguate misure di compenso di tale fattore di rischio)

Descrivere le misure di compenso, se applicate:_____
_____
_____
_____

FR.AC.5) ASSENZA di linee di distribuzione esterne o scarsamente/per nulla isolate termicamente

□ Si □ No□ Non applicabile (sono già in atto adeguate misure di compenso di tale fattore di rischio)

Descrivere le misure di compenso, se applicate:_____
_____
_____
_____

FR.AC.6) Il monitoraggio delle temperature ha evidenziato che tutte le temperature d'erogazione dell'acqua calda sanitaria sono superiori ai 50°C?□ Si □ No□ Non applicabile (sono già in atto adeguate misure di compenso di tale fattore di rischio)

Descrivere le misure di compenso, se applicate:_____
_____
_____
_____

FR.AC.7) Il monitoraggio delle temperature ha evidenziato che la temperatura di stoccaggio dell'acqua calda sanitaria è superiore ai 60°C? □ Si □ No □ Non applicabile (se non presenti serbatoi d'acqua calda sanitaria o se sono già in atto adeguate misure di compenso di tale fattore di rischio)

Notazioni:_____
_____
_____
_____

Lavori di ristrutturazione

Sono state effettuate modifiche della rete idrica negli ultimi 12 mesi? □ Si □ No

Descrizione tipologia
d'intervento:_____
_____
_____

Impianto di raffreddamento a torre evaporativa/condensatore evaporativo

Presenza di torre di raffreddamento/condensatore evaporativo □ Si □ No

Esercizio □ Annuale □ Stagionale da _____a_____

FR.TC.1) Se presente torre/condensatore, è applicato un trattamento biocida? □ Si □ No

Descrizione tipologia del trattamento biocida, se applicato:_____
_____
_____
_____

FR.TC.2) Se presente torre/condensatore, è applicato un trattamento contro le corrosioni e le incrostazioni? □ Si □ No

Descrizione tipologia del trattamento contro le corrosioni e le incrostazioni, se applicato:_____
_____
_____
_____

FR.TC.3) Se presente torre/condensatore, è effettuato un intervento di pulizia (chimica e/o fisica) e disinfezione biocida shock con frequenza media semestrale? □ Si □ No

Notazioni:_____
_____
_____

Ispezione impianti aeraulici

Presenza di impianti aeraulici □ Si □ No

Se presenti, essi prevedono l'umidificazione dell'aria con l'utilizzo dell'acqua allo stato liquido?

□ Si □ No

Notazioni:_____
_____
_____
_____

FR.IA.1) Se è utilizzato il sistema d'umidificazione dell'aria con l'utilizzo dell'acqua allo stato liquido, è presente un sistema di disinfezione od una procedura equivalente finalizzata al mantenimento di idonee condizioni d'igiene di tale acqua d'umidificazione? □ Si □ No □ Non applicabile (se non presente o scollegato definitivamente il sistema d'umidificazione dell'aria con l'utilizzo dell'acqua allo stato liquido)

Se presente, il trattamento dell'acqua d'umidificazione applicato è:_____
_____
_____
_____

Se presente un sistema di disinfezione dell'acqua d'umidificazione, il disinfettante usato è:_____
_____

Se presente un sistema di disinfezione, è disponibile la Scheda di Sicurezza del disinfettante ad indicarne la sua composizione? □ Si □ No

Se presente un sistema di disinfezione, il dosaggio è □ Automatico □ Manuale

Notazioni:_____
_____
_____
_____

FR.IA.2) E' previsto un programma di regolare ispezione, pulizia e sanificazione degli impianti aeraulici? □ Si □ No

Notazioni:_____
_____
_____

Ispezione altri impianti idrici

Presenza di riuniti odontoiatrici □ Si □ No

FR.RO) Se presenti, è applicato ad essi uno specifico piano di manutenzione, che ne preveda un'adeguata pulizia e disinfezione?□ Si □ No

Notazioni:_____
_____
_____
_____

Presenza di piscine □ Si □ No

FR.PI) Se presenti, è applicato ad esse uno specifico piano di manutenzione, che ne preveda un'adeguata pulizia e disinfezione?□ Si □ No

Notazioni:_____
_____
_____
_____

Presenza di vasche idromassaggio □ Si □ No

FR.VI) Se presenti, è applicato ad esse uno specifico piano di manutenzione, che ne preveda un'adeguata pulizia e disinfezione?□ Si □ No

Notazioni:_____
_____
_____
_____

Presenza dell'impianto d'irrigazione □ Si □ No

FR.IR) Se presente, esso è esercitato in orari e/o modalità tali da minimizzare l'esposizione ad aerosol d'acqua rilasciati dall'impianto?□ Si □ No

Notazioni:_____
_____
_____
_____

Preenza di fontane □ Si □ No

Le fontane sono □ All'interno dell'edificio □ All'esterno dell'edificio

FR.FO) Se presenti, è applicato ad esse uno specifico piano di manutenzione, che ne preveda un'adeguata pulizia e, se valutato necessario, disinfezione?□ Si □ No

Notazioni:_____
_____
_____
_____

Fattori di Rischio (FR) individuati - Stima dell'attuale livello di Controllo del Rischio Legionellosi per le seguenti tipologie d'impianti: acqua fredda e calda sanitaria, a torre evaporativa o condensatore evaporativo ed aeraulici.

La stima è da ottenersi seguendo i 2 passaggi definiti a seguire:

1. Si sommino il numero di domande di rischio (identificate dall'acronimo FR) per le quali è stata fornita risposta negativa (No).
Non si devono pertanto conteggiare né le domande di rischio (FR) per le quali è stata fornita risposta positiva (Si) né le domande di rischio (FR) per le quali la domanda di rischio non era applicabile al caso specifico.

2. Si verifichi, nella tabelle a seguire, specifiche per ciascuna tipologia d'impianto considerato (acqua fredda e calda sanitaria, a torre evaporativa o condensatore evaporativo ed aeraulici), ove ricada il numero ottenuto. Le tabelle forniscono le indicazioni per la stima dell'attuale livello di Controllo del Rischio legionellosi di ciascun impianto oggetto di tale preliminare Valutazione:

IMPIANTO ACQUA FREDDA SANITARIA		
Numero di domande di rischio (FR.AF) alle quali è stata fornita risposta negativa (No)	**Stima dell'attuale livello di Controllo del Rischio Legionellosi**	**Livello di Rischio**
Uguale o superiore a 5	Controllo del Rischio da incrementare immediatamente, intervenendo sui fattori di Rischio individuati (FR.AF).	3 su 3
Compreso tra 2 e 4	Controllo del Rischio da migliorare, attivando celermente azioni di controllo dei Fattori di Rischio individuati (FR.AF).	2 su 3
Inferiore o uguale a 1	Controllo del Rischio complessivamente adeguato. Prestare comunque attenzione al Fattore di Rischio (qualora) individuato (FR.AF) e ridurlo ove possibile	1 su 3

IMPIANTO ACQUA CALDA SANITARIA		
Numero di domande di rischio (FR.AC) alle quali è stata fornita risposta negativa (No)	**Stima dell'attuale livello di Controllo del Rischio Legionellosi**	**Livello di Rischio**
Uguale o superiore a 5	Controllo del Rischio da incrementare immediatamente, intervenendo sui fattori di Rischio individuati (FR.AC).	3 su 3
Compreso tra 2 e 4	Controllo del Rischio da	2 su 3

	migliorare, attivando celermente azioni di controllo dei Fattori di Rischio individuati (FR.AC).	
Inferiore o uguale a 1	Controllo del Rischio complessivamente adeguato. Prestare comunque attenzione al Fattore di Rischio (qualora) individuato (FR.AC) e ridurlo ove motivato opportuno.	1 su 3

IMPIANTO A TORRE EVAPORATIVA - CONDENSATORE EVAPORATIVO		
Numero di domande di rischio (FR.TC) alle quali è stata fornita risposta negativa (No)	**Stima dell'attuale livello di Controllo del Rischio Legionellosi**	**Livello di Rischio**
Uguale a 3	Controllo del Rischio da incrementare immediatamente, intervenendo sui fattori di Rischio individuati (FR.TC).	3 su 3
Uguale a 2	Controllo del Rischio da migliorare, attivando celermente azioni di controllo dei Fattori di Rischio individuati (FR.TC).	2 su 3
Uguale o inferiore a 1	Controllo del Rischio complessivamente adeguato. Prestare comunque attenzione al Fattore di Rischio (qualora) individuato (FR.TC) e ridurlo ove motivato opportuno.	1 su 3

IMPIANTO AERAULICO		
Numero di domande di rischio (FR.IA) alle quali è stata fornita risposta negativa (No)	**Stima dell'attuale livello di Controllo del Rischio Legionellosi**	**Livello di Rischio**
Uguale a 2	Controllo del Rischio da incrementare immediatamente, intervenendo sui fattori di Rischio individuati (FR.IA).	3 su 3
Uguale a 1	Controllo del Rischio da migliorare, attivando celermente azioni di controllo del Fattore di Rischio individuato (FR.IA).	2 su 3

ALTRI IMPIANTI IDRICI
Per tale categoria d'impianti, l'avere fornito risposta negativa alla rispettiva domanda di rischio (FR.RO, FR.PI, FR.VI, FR.IR, FR.FO), determina che il Controllo del Rischio sia da

incrementare immediatamente, intervenendo sulla mancanza individuata.

Schema di conteggio del numero di domande di rischio (identificate dall'acronimo FR) per le quali è stata fornita risposta negativa (No). In caso di molteplici impianti appartenenti alla medesima categoria (acqua fredda sanitaria, acqua calda sanitaria, torre/condensatore evaporativo, aeraulico) è necessario rispondere alla rispettiva serie di domande di rischio, per **ogni** impianto idrico/aeraulico presente, oggetto di valutazione.

FR.AF.1) □ Si □ No □ Non applicabile
FR.AF.2) □ Si □ No □ Non applicabile
FR.AF.3) □ Si □ No □ Non applicabile
FR.AF.4) □ Si □ No □ Non applicabile
FR.AF.5) □ Si □ No □ Non applicabile
FR.AF.6) □ Si □ No □ Non applicabile

Numero totale di domande di rischio per le quali è stata fornita risposta negativa (No):_____

Livello di Rischio: _____

FR.AC.1) □ Si □ No □ Non applicabile
FR.AC.2) □ Si □ No □ Non applicabile
FR.AC.3) □ Si □ No □ Non applicabile
FR.AC.4) □ Si □ No □ Non applicabile
FR.AC.5) □ Si □ No □ Non applicabile
FR.AC.6) □ Si □ No □ Non applicabile
FR.AC.7) □ Si □ No □ Non applicabile

Numero totale di domande di rischio per le quali è stata fornita risposta negativa (No):_____

Livello di Rischio: _____

FR.TC.1) □ Si □ No
FR.TC.2) □ Si □ No
FR.TC.3) □ Si □ No

Numero totale di domande di rischio per le quali è stata fornita risposta negativa (No):_____

Livello di Rischio: _____

FR.IA.1) □ Si □ No □ Non applicabile
FR.IA.2) □ Si □ No

Numero totale di domande di rischio per le quali è stata fornita risposta negativa (No):_____

Livello di Rischio: _____

Interventi raccomandati

_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____
_____

Nome e Cognome del Tecnico dell'Organo Pubblico di Controllo chi ha effettuato la valutazione del rischio:_____

Data e firma: _____

ALLEGATO 13: Metodi di prevenzione e controllo della contaminazione del sistema idrico

Misure a breve termine

Poiché in assenza di interventi strutturali i metodi massivi di disinfezione non sono sufficienti ad eliminare definitivamente la presenza di *Legionella* dalle reti di distribuzione di acqua calda, è necessario mettere in atto le seguenti misure a breve termine indicate, in ogni caso, come buone pratiche di manutenzione di un impianto idrico per prevenire e contenere la contaminazione:

- Decalcificazione degli elementi meno usurati mediante immersione in soluzione acida (acido sulfamico, acido acetico, ecc.) e successiva disinfezione, per un tempo non inferiore a 30 min, in acqua fredda contenente almeno 50 mg/L di cloro libero.
- Sostituzione di giunti, filtri ai rubinetti, soffioni e tubi flessibili usurati alle docce, nonché di ogni altro elemento di discontinuità. La frequenza della sostituzione è usualmente in funzione delle caratteristiche dell'acqua. Ad esempio maggiore è la durezza dell'acqua, più frequente sarà la formazione di calcare e quindi l'usura degli elementi idraulici.

Nell'espletamento delle operazioni sopra descritte occorre operare in conformità ai dettami del D.Lgs. 81/2008 e *s.m.i.*, al fine di attuare tutte le misure di sicurezza necessarie ad esercitare la tutela prevista nei confronti del rischio di esposizione degli operatori e degli utenti a *Legionella* nelle strutture sottoposte a trattamento.

Misure a lungo termine

Filtrazione al punto di utilizzo

La microfiltrazione consente la rimozione di *Legionella* dall'acqua in uscita al punto di utilizzo mediante l'impiego di una barriera meccanica (0,2 μm). E' un sistema di trattamento localizzato, facile da installare, basato sull'impiego di filtri che devono essere sostituiti con regolarità a causa del progressivo intasamento. Trova applicazione, in particolar modo, nei reparti dove sono ricoverati pazienti ad elevato rischio.

Trattamento Termico

Numerosi studi hanno dimostrato l'effetto inattivante prodotto dall'incremento di temperatura dell'acqua calda nelle reti idriche ospedaliere ed alberghiere. Negli impianti, ove l'acqua è costantemente mantenuta a temperature comprese tra 50 e 55°C, viene inibita la proliferazione di *Legionella*. Valori superiori a 60°C riducono il numero di colonie in modo proporzionale al tempo di esposizione (pastorizzazione).

Per il trattamento di disinfezione si utilizzano due approcci: lo shock termico e la disinfezione termica.

Shock termico

Procedura

Consiste nell'elevare la temperatura dell'acqua a 70-80°C per tre giorni consecutivi assicurando il suo deflusso da tutti i punti di erogazione per almeno 30 min al giorno. Alcuni autori raccomandano lo svuotamento preventivo dei serbatoi di acqua calda, la loro pulizia e la successiva decontaminazione con 100 mg/L di cloro per 12-14 ore. Durante lo shock termico è fondamentale verificare che la temperatura dell'acqua raggiunga o ecceda i 60°C nei punti distali dell'impianto, altrimenti la procedura non assicura il raggiungimento dell'obiettivo. Al termine del trattamento occorre effettuare un controllo batteriologico su campioni di acqua prelevati nei punti distali dell'impianto. In caso di risultato sfavorevole, è necessario ripetere l'intera procedura fino alla decontaminazione della rete. In seguito occorre verificare periodicamente la presenza del batterio applicando i criteri riportati nel Capitolo 3.

Vantaggi

Non richiede particolari attrezzature e quindi può essere messa in atto immediatamente, soprattutto in presenza di un *cluster* epidemico.

Svantaggi

Questa procedura, pur garantendo una buona efficacia, è di difficile attuazione in quanto spesso gli impianti non permettono il raggiungimento di dette temperature. Ha costi elevati in quanto richiede un elevato consumo di energia tale, a volte, da non essere compatibile con le vigenti disposizioni in materia di risparmio energetico. Inoltre, può essere causa di ustioni agli utenti della rete idrica.

Richiede tempo e personale nonché l'installazione di sonde remote e strumenti per il controllo sia del tempo di scorrimento che della temperatura dell'acqua nei serbatoi e nei punti distali.

E' una modalità di disinfezione sistemica ma temporanea, in quanto non impedisce la ricolonizzazione dell'impianto idrico in un periodo di tempo variabile da alcune settimane ad alcuni mesi dal trattamento qualora la temperatura dell'acqua circolante scenda al di sotto dei 50°C.

La tenuta idraulica dell'impianto potrebbe essere compromessa da ripetuti shock termici soprattutto in presenza di tubazioni in materiale plastico.

Durante il trattamento è necessario interdire l'uso dell'acqua calda sanitaria da parte degli utenti e degli operatori al fine di evitare il rischio di ustioni.

Mantenimento costante della temperatura a 60°C a monte della miscelazione con acqua fredda (disinfezione termica)

Procedura

Si applica agevolmente agli impianti con doppio sistema di regolazione della temperatura dell'acqua, nei quali il primo (costituito da un termostato regolato a 60°C) serve a regolare la temperatura di accumulo nei bollitori, mentre il secondo (costituito da un miscelatore con acqua fredda posto all'uscita del bollitore) viene impiegato nel controllo della temperatura di distribuzione di acqua calda a 48-53°C. In base alle temperature utilizzate, la *Legionella* non può svilupparsi nei bollitori, ma soltanto nelle reti di distribuzione e di ricircolo.

La disinfezione termica di questi impianti viene effettuata applicando la seguente procedura:

- si innalza a 65°C la temperatura di produzione dell'acqua calda sanitaria all'interno dei bollitori (regolazione primaria);
- si inibisce la miscelazione con acqua fredda attivando un by-pass al miscelatore mediante l'impiego di una valvola elettrica a due vie asservita ad un orologio programmatore;

- si effettua il ricircolo dell'acqua a 55-60°C in tutto l'impianto di distribuzione per almeno 30 min al giorno, preferibilmente durante le ore notturne al fine di limitare il consumo di acqua da parte degli utenti.

Vantaggi

Negli impianti dotati del doppio sistema di regolazione della temperatura descritto in precedenza, può essere messa in atto immediatamente. Non introduce contaminanti o sottoprodotti di disinfezione.

Svantaggi

Questa procedura, pur garantendo una buona efficacia, richiede un elevato consumo di energia tale, a volte, da non essere compatibile con le vigenti disposizioni in materia di risparmio energetico. Inoltre, può essere causa di ustioni agli utenti della rete idrica.

Nel caso di impianti in cui l'acqua calda è prodotta e distribuita a 48-50°C (ovvero ad una temperatura leggermente superiore a quella di utilizzo) la regolazione finale è lasciata ai singoli rubinetti (impianti con singola regolazione). In tali condizioni, a causa della minore temperatura, il batterio della *Legionella* può colonizzare sia i bollitori che le reti di distribuzione e di ricircolo. La disinfezione termica di questi impianti non è agevole dal momento che:

- possono essere utilizzati solo sistemi di regolazione a punto fisso con almeno due livelli (quello di esercizio a 48-50°C e quello di disinfezione a 65°C);
- è difficile tenere sotto controllo il tempo di disinfezione in quanto occorre elevare la temperatura non solo ai bollitori, ma anche nelle reti di distribuzione;
- anche dopo il trattamento, si è costretti a distribuire acqua troppo calda, non essendo presente una regolazione indipendente a valle dei bollitori.

Normalmente, considerando tali difficoltà, è opportuno modificare il sistema di regolazione adottando quello basato sull'uso del termostato e del miscelatore.

Irraggiamento UV

La luce ultravioletta a 254 nm è in grado di inattivare i batteri dimerizzando la timina presente nel DNA in modo da ostacolarne la replicazione. E' un metodo alternativo di disinfezione efficace in prossimità del punto di applicazione. Non avendo effetto residuo, non è adeguato, come unica modalità, al trattamento di un intero edificio dal momento che *Legionella* persiste nel biofilm, nei punti morti e nelle sezioni stagnanti dell'impianto.

Procedura

L'apparecchio deve essere installato in prossimità del punto di utilizzo. L'acqua fluisce all'interno di una camera idraulica, dove viene esposta alla luce ultravioletta generata da lampade al mercurio. All'origine dell'irraggiamento UV è necessario applicare lo shock termico o la clorazione al fine di contenere la contaminazione microbiologica nel resto dell'impianto.

Vantaggi

L'apparecchio viene facilmente installato negli impianti idrici pre-esistenti.

Non sono stati riscontrati effetti avversi alle caratteristiche igienico-sanitarie dell'acqua o all'integrità delle tubature. A differenza di quanto accade con i disinfettanti chimici, il sapore dell'acqua non viene influenzato. Ad oggi non è stata riscontrata la formazione di sottoprodotti.

Svantaggi

L'irraggiamento UV risulta efficace se lo spessore del filetto fluido è limitato (in genere fino a 3 cm) e se l'acqua è scarsamente torbida. La mancanza di effetto residuo nei punti distali ne limita le potenzialità.

Clorazione

Il cloro è un agente ossidante utilizzato con successo nel controllo igienico-sanitario delle acque potabili. L'inattivazione e la soppressione di *L. pneumophila* richiedono una concentrazione costante compresa tra 1 e 3 mg/L.

Per il trattamento di disinfezione si utilizzano due approcci: l'iperclorazione shock e l'iperclorazione continua. Tali procedure implicano un conseguente aumento della concentrazione in acqua del cloro residuo e dei potenziali sottoprodotti di disinfezione.

La concentrazione ottimale di cloro da impiegare nei due approcci varia in base alle proprietà chimiche e chimico-fisiche dell'acqua e alle caratteristiche strutturali dell'impianto. Inoltre, dal momento che la sua attività biocida decresce rapidamente in ambiente alcalino, è necessario mantenere il pH dell'acqua a valori compresi tra 6 e 7 al fine di ridurre la sua concentrazione senza alterarne l'efficacia.

Iperclorazione shock

Procedura

Viene praticata, dopo aver disattivato il riscaldamento del boiler ed atteso il raffreddamento dell'impianto a temperature non superiori a 30°C, sull'acqua fredda di reintegro effettuando una singola immissione di disinfettante (ipoclorito di sodio o di calcio) fino ad ottenere concentrazioni di cloro residuo libero di 20-50 mg/L in tutta la rete, ivi compresi i punti distali. Dopo un periodo di contatto di 2 h per 20 mg/L di cloro oppure di 1 h per 50 mg/L di cloro, l'acqua presente nel sistema di distribuzione viene drenata e sostituita con una nuova immissione di acqua fredda in quantità tale da ridurre la concentrazione di cloro residuo entro l'intervallo di 0,5-1,0 mg/L presso i punti distali dell'impianto.

Vantaggi

L'iperclorazione shock è un trattamento disinfettante forte.

Svantaggi

E' una modalità di disinfezione sistemica ma temporanea, in quanto non impedisce la ricolonizzazione dell'impianto idrico in un periodo di tempo variabile da alcune settimane ad alcuni mesi dal termine del trattamento. Ha un'azione fortemente corrosiva nei confronti dei materiali impiegati nelle reti idriche. Durante il trattamento è necessario interdire l'uso dell'acqua calda sanitaria da parte degli utenti e operatori al fine di evitare l'esposizione ad elevate concentrazioni del disinfettante.

Iperclorazione continua

Procedura

Si ottiene con l'aggiunta continua di cloro che può essere introdotto, di norma, sotto forma di ipoclorito di calcio o di sodio. I livelli residui di cloro in questo caso possono variare a seconda della qualità dell'acqua, del flusso e della presenza di biofilm; ad ogni modo il disinfettante residuo deve essere compreso tra 1 e 3 mg/L.

Vantaggi

L'iperclorazione continua è una modalità di disinfezione generale che garantisce una concentrazione residua del disinfettante in tutto il sistema di distribuzione dell'acqua in modo da minimizzare la colonizzazione da *Legionella* nei punti distali.

Svantaggi

Il cloro è corrosivo e può provocare danni alle tubature. La concentrazione necessaria al trattamento non è compatibile con gli standard attuali sull'acqua potabile sia in termini di

disinfettante residuo che come formazione di sottoprodotti. Pertanto, durante tutta la durata dell'iperclorazione continua, si raccomanda l'adozione di misure cautelative nei confronti di pazienti e/o operatori affetti da patologie cutanee o, comunque, sensibili alla presenza di cloro residuo ai livelli impiegati. E' inoltre necessario interdire l'uso potabile dell'acqua calda sanitaria (in particolare nella preparazione di cibi e bevande calde), informando al contempo l'utenza.

Disinfezione con biossido di cloro

Il biossido di cloro è stato utilizzato con successo in acquedottistica e successivamente applicato nel controllo della contaminazione da *Legionella* negli impianti per la produzione di acqua sanitaria. Rispetto al cloro ha il vantaggio di essere più attivo nei confronti del biofilm. Mostra una diversa efficacia in funzione dei materiali impiegati nella rete di distribuzione (maggiore su gomma rispetto alla plastica, mentre non sembra impiegabile in presenza di tubazioni in rame).

Procedura

Il biossido di cloro viene prodotto in loco utilizzando un apposito generatore installato in prossimità del punto di immissione in rete. La concentrazione efficace consigliata da alcuni autori varia tra 0,1 e 1,0 mg/L a seconda delle peculiarità dell'impianto, delle caratteristiche chimiche dell'acqua e del livello quali-quantitativo della contaminazione da *Legionella*.

In caso di forte contaminazione microbiologica, è stato proposto il lavaggio temporaneo della rete di distribuzione con biossido di cloro a concentrazioni comprese tra 5 e 10 mg/L, assicurando il flussaggio di tutti i punti di prelievo. Al termine del breve trattamento shock, durante il quale deve essere interdetto il consumo dell'acqua calda sanitaria ad uso potabile, quest'ultima viene drenata e sostituita con un nuovo apporto fino a ridurre la concentrazione del biocida ai livelli di routine (0,1-1,0 mg/L).

Vantaggi

La sua azione non è influenzata dal pH dell'acqua trattata o dalla presenza di inibitori della corrosione. Non produce composti organoalogenati. Riduce la crescita del biofilm.

Svantaggi

Dà luogo alla formazione di sottoprodotti inorganici (clorito e clorato) della disinfezione. Alle concentrazioni più elevate (> 0,4 mg/L) manifesta un'azione corrosiva nei confronti delle reti di distribuzione dell'acqua calda sanitaria ed influisce negativamente sulla qualità dell'acqua distribuita.

Ozonizzazione

L'ozono è un eccellente biocida in grado di danneggiare irreversibilmente il DNA dei microorganismi. Viene introdotto in acqua alla concentrazione di 1-2 mg/L da un generatore operante in funzione della velocità di flusso dell'acqua da trattare. Essendo caratterizzato da un tempo di emivita estremamente breve non mostra effetto residuo, per cui non può essere impiegato nel trattamento sistemico dell'impianto. Ha un minimo impatto sul biofilm, produce sottoprodotti e, ad alte dosi, può danneggiare le condutture. La sua efficacia risulta moderatamente influenzata dal pH e dalla temperatura dell'acqua.

Disinfezione con monoclorammina

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

Procedura

Viene introdotto in acqua alla concentrazione di 2-3 mg/L.

Vantaggi

Ha la stessa modalità di azione del cloro, ma decade più lentamente in quanto è scarsamente volatile e non forma trialometani con la sostanza organica disciolta. La maggiore persistenza in acqua rispetto al cloro e al biossido di cloro ne assicura una più efficace diffusione nelle zone stagnanti e all'interno del biofilm. In generale presenta una maggiore compatibilità con i materiali impiegati nelle reti di distribuzione. E' tuttavia incompatibile con alcuni tipi di gomma impiegata nelle guarnizioni idrauliche.

Svantaggi

Alcuni studi hanno evidenziato la formazione di N-nitrosodimetilammina e un incremento della concentrazione dello ione nitrito. Allo stato attuale necessita di ulteriori conferme sperimentali.

Ionizzazione rame-argento

Metalli come il rame e l'argento sono noti agenti battericidi: l'effetto è dovuto principalmente alla loro azione sulla parete cellulare del microrganismo, che comporta una distorsione della permeabilità cellulare. Ciò, unito alla denaturazione proteica, determina la lisi cellulare.

Procedura

Gli ioni rame ed argento sono generati elettroliticamente in quantità proporzionale all'intensità di corrente applicata agli elettrodi ed al tempo di elettrolisi. La concentrazione in acqua, proposta da alcuni autori, è di 0,02-0,08 mg/L per lo ione argento e di 0,2-0,8 mg/L per lo ione rame.

L'impiego di questa tecnica necessita di verifiche sperimentali sull'efficacia nel sistema di applicazione.

Vantaggi

Il metodo è di facile applicazione e non è influenzato dalla temperatura dell'acqua. Inoltre, a causa dell'accumulo del rame nel biofilm l'effetto battericida persiste per alcune settimane dalla disattivazione del sistema di trattamento riducendo la possibilità di ricolonizzazione. Ad oggi non è stata riscontrata la formazione di sottoprodotti di disinfezione.

Svantaggi

Poiché le concentrazioni degli ioni rame ed argento sono soggette a fluttuazioni, è necessario controllare sistematicamente il loro valore nonché il pH dell'acqua (valore ottimale: 6-8). Sia il cloro libero residuo che gli inibitori della corrosione possono alterare la concentrazione degli ioni rame, riducendone l'efficacia.

Tale tecnica non è adatta al trattamento di reti idriche in acciaio inox, acciaio zincato e rame a causa di fenomeni ossido-riduttivi che si possono innescare tra le tubazioni ed il disinfettante.

Disinfezione con perossido di idrogeno e ioni argento

Il trattamento viene effettuato tramite una soluzione stabile e concentrata contenente perossido di idrogeno (acqua ossigenata) e ioni argento, sfruttando l'azione battericida di ciascun componente e la sinergia che tra di loro si sviluppa (effetto catalitico dello ione argento). L'impiego di questo disinfettante è relativamente recente e necessita ulteriori conferme sperimentali.

Procedura

Il reagente, in soluzione stabilizzata, viene immesso in rete mediante una pompa dosatrice controllata da un idoneo dispositivo di regolazione in funzione del flusso dell'acqua da trattare. La concentrazione in acqua proposta da alcuni autori per il controllo della contaminazione della rete idrica è di 10 mg/L per il perossido di idrogeno e di 10 µg/L per lo ione argento.

Vantaggi

L'azione ossidante del perossido di idrogeno è meno aggressiva di quella esercitata dal biossido di cloro o dal cloro. Ad oggi non è stata segnalata la formazione di sottoprodotti inorganici ed organici.

La concentrazione di ioni argento è estremamente modesta e se ben gestita non determina carichi inquinanti.

Svantaggi

Allo stato attuale non esistono ancora prove esaustive sul comportamento dinamico di tale disinfettante nel tempo. Uno studio recente ha evidenziato la sua scarsa efficacia nei confronti di *Legionella pneumophila* sierogruppo 1 sottotipo Philadelphia.

Poiché le concentrazioni di perossido di idrogeno e di ioni argento sono soggette a fluttuazioni, è necessario controllare sistematicamente il loro valore.

Tale tecnica non è adatta al trattamento di reti idriche in acciaio zincato dal momento che lo zinco è in grado di rimuovere l'argento per ossidoriduzione.

Disinfezione con acido peracetico

Alcune esperienze hanno dimostrato una discreta efficacia di questo biocida nei trattamenti shock.

MINISTERO DELLA SALUTE
Direzione Generale della Prevenzione
Uff. V Malattie Infettive e Prof. Internazionale
via Giorgio Ribotta, 5 - 00144 Roma
tel.: 0659943925 - fax: 0659943096

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'
Registro Nazionale delle Legionellosi
Dip. MIPI Tel.06/49902856 Fax 6/49387112
CNESPS Tel. 06/49904269 Fax 06/44232444
Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma

SCHEDA DI SORVEGLIANZA DELLA LEGIONELLOSI

N. Scheda ☐☐☐☐ Data ☐☐☐

Ospedale Notificante_____

Cognome Nome del paziente_____

Data di nascita ☐☐☐ Sesso M☐ F☐

Indirizzo di residenza_____

Data Insorgenza sintomi ☐☐☐ Data Ricovero Ospedaliero ☐☐☐

Data Dimissione ☐☐☐

Esito: Miglioramento/Guarigione ☐ Decesso ☐ Non noto ☐

Diagnosi clinica

segni di polmonite focale rilevabili all'esame clinico SI☐ NO☐

esame radiologico suggestivo di interessamento polmonare SI☐ NO☐

Diagnosi di laboratorio

Isolamento del germe SI☐ NO☐

Se si, specificare da quale materiale biologico_____

specie e siero gruppo identificati_____

Sierologia SI NO

1° siero: n. gg da inizio sintomi_____titolo_____specie e sg_____

2° siero: n. gg da inizio sintomi_____titolo_____specie e sg_____

Rilevazione antigene urinario Pos☐ Neg☐ Non eseguita☐ Data ☐☐☐

Immunofluorescenza diretta Pos☐ Neg☐ Non eseguita☐ Data ☐☐☐

Biologia molecolare (PCR) Pos☐ Neg☐ Non eseguita☐ Data ☐☐☐
(metodo non ancora validato)

Fattori di rischio

Abitudine al fumo SI☐ NO☐ da quanto tempo_____ quantità ☐☐

Abitudine all'alcool SI☐ NO☐ quantità_____

Malattie concomitanti SI☐ NO☐ Specificare_____

Trapianto d'organo SI☐ NO☐ Specificare_____

In terapia con corticosteroidi o immunosoppressori: SI☐ NO☐

Attività lavorativa

Mansione_____

Nome dell'azienda_____Indirizzo_____

con esposizione professionale ad acqua aerosolizzata SI☐ NO☐ NON NOTO☐

con utilizzo della doccia SI☐ NO☐ NON NOTO☐

in luoghi con presenza di torri di raffreddamento SI☐ NO☐ NON NOTO☐

Specificare il reparto e l'ultimo giorno di lavoro_____

Cure odontoiatriche nei 10 giorni precedenti l'esordio SI☐ NO☐

specificare ambulatorio/struttura e data_____

Ricovero Ospedaliero nei 10 giorni precedenti l'esordio SI☐ NO☐

Ospedale_____Reparto_____

Periodo da ☐☐☐ a ☐☐☐

Ricovero presso strutture sanitarie/socio-sanitarie SI ☐ NO ☐

Tipo di struttura_____Nome_____

Comune_____periodo: da |__|__|__| a |__|__|__|

Soggiorno nei 10 giorni precedenti all'esordio, in luoghi diversi dalla propria abitazione SI ☐ NO ☐

Specificare tipo di struttura recettiva: (es. albergo, terme, campeggio, nave, parchi acquatici, fiere espositive, ecc..)_____

Nome e indirizzo_____n. stanza_____

Eventuale nome operatore turistico_____

In gruppo ☐ Individuale ☐ periodo: da |__|__|__| a |__|__|__|

Attività di giardinaggio, uso di autolavaggio, esposizione a nebulizzatori d'acqua, ecc.

SI ☐ NO ☐

specificare sito_____ e data:

Trattamenti e cure inalatorie (anche presso stabilimenti termali), aerosol, ossigenoterapia

SI ☐ NO ☐ NON NOTO ☐

Nome e indirizzo_____

Uso di docce, vasche per idromassaggio presso impianti sportivi/stabilimenti balneari o frequentazione di centri benessere e piscine, nei 10 giorni precedenti l'esordio SI ☐ NO ☐

Specificare tipo di struttura_____

Indagine Ambientale a cura del Dipartimento di Prevenzione SI ☐ NO ☐

Se SI, specificare il luogo e il materiale analizzato_____

Se SI ☐ Positiva ☐ Negativa ☐

Se Positiva specificare Specie e Sierogruppo _____

Note_____

_____

Generalità e recapito del medico compilatore

NomeCognome_____

Ospedale_____Reparto_____

Indirizzo_____ Tel._____Fax_____

Data Compilazione |__|__|__|

Allegato 11 - Questionario per l'indagine di focolai epidemici

Caso n° _____ Focolaio_____

Riferimento scheda di sorveglianza della legionellosi n°_____ dell'anno_____

Data dell'intervista |__|__|__|

Informazioni personali

Nome e cognome:_____

Data di nascita: |__|__|__| Età: ___ Sesso: Maschio ☐ Femmina ☐

Residenza: via_____ Tel._____

Comune_____ Provincia_____

Domicilio abituale: via _____ Tel._____

Comune_____ Provincia_____

Persona che risponde al questionario

Caso ☐ o moglie/marito ☐ fratello/sorella ☐ amico o altro parente ☐

La persona vive con il paziente ? Si ☐ No ☐

Nome e cognome_____Tel._____

Ospedalizzazione per legionellosi

Ospedale_____ Reparto_____

Medico ospedaliero_____

Medico di base_____ Tel._____

Data di inizio |__|__|__|

Ricovero |__|__|__| Data di dimissione |__|__|__|

Esito Guarito ☐ Ancora malato ☐

Deceduto ☐ Data del decesso |__|__|__|

Specie/ Sierogruppo isolati

☐ L. pneumophila sierogruppo 1 ☐ L. pneumophila, altri sierogruppi (specificare): _____

☐ Altre specie (specificare) : _____

☐ Tipizzazione in corso

Commenti : _____

Fattori di rischio

E' stato sottoposto a chemioterapia SI ☐ No ☐ Non so ☐

Se si , data |__|__|__|

Le sono stati somministrati dei corticosteroidi, per via sistemica, nelle 4 settimane precedenti l'inizio dei sintomi?

SI ☐ No ☐ Non so ☐

E' stato sottoposto ad ossigenoterapia a domicilio nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi?

SI ☐ No ☐ Non so ☐

Ha ricevuto trattamenti medici nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi? (fisioterapia, visite odontoiatriche, cure termali, ecc.) SI ☐ No ☐ Non so ☐

Se si, dove e come?_____

Ha ricevuto trattamenti medici in regime di ricovero nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi?

Se si , in quale ospedale?_____

In quale reparto?_____ stanza n°___dal |__|__|__| al |__|__|__|

Fuma? Si ☐ No ☐ Non so ☐

Beve alcolici? Si ☐ No ☐ Non so ☐

Esposizione professionale

Professione : _____

Ha lavorato nei 10 giorni precedenti l'inizio della malattia : Si ☐ No ☐

Luogo di lavoro : _____

Percorso casa-lavoro : _____

_____

Mezzo di trasporto: a piedi ☐ automobile ☐ bicicletta ☐ bus ☐ treno ☐

C'erano lavori in corso vicino al suo posto di lavoro? Si ☐ No ☐ Non so ☐

Se si, di che tipo (costruzione o scavi) : _____

A quale distanza circa dal luogo di lavoro :_____

Dove pranza di solito : _____

_____

_____

Il suo lavoro è: in un solo posto ☐ comporta viaggi ☐

Ha fatto una doccia nel luogo di lavoro nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi:

Si ☐ No ☐ Non ricordo ☐

Se si, quante volte? _____

Nel luogo dove lavora c'è l'aria condizionata Si ☐ No ☐ Non so ☐

Se si, c'è una torre di raffreddamento Si ☐ No ☐ Non so ☐

C'è una torre di raffreddamento vicino al suo posto di lavoro:

Si ☐ No ☐ Se si, dove : _____

Abitazione

Vive in:
Casa indipendente ☐ Condominio ☐ Altro _____
Se vive in un condominio, la produzione di acqua calda
nel suo appartamento è
Autonoma ☐ Condominiale ☐ Non so ☐

Tipo di caldaia
Ad accumulo ☐ Boiler ☐ Istantanea ☐ Non so ☐

L'acqua potabile è:
Municipale ☐ Individuale (pozzo, sorgente…) ☐

Se individuale: approvigionamento da:
pozzo ☐ sorgente ☐ Misto ☐ Non so ☐

Ha fatto :
Bagno ☐ Quante volte : _____
Doccia ☐ Quante volte : _____
Si è lavato nel lavandino ☐ Quante volte : _____

Bagno con idromassaggio Si ☐ No ☐

Se si, dove _____ quando _____

Utilizza un umidificatore domestico Si ☐ No ☐
Se si, di che tipo
Vapore caldo ☐ Vapore freddo ☐ Ultrasuoni ☐ Sistema centralizzato ☐

Ha un impianto di aria condizionata: Si ☐ No ☐
Se si, era in funzione nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi?
Si ☐ No ☐ Non ricordo ☐

Nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi sono stati effettuati lavori idraulici
a casa sua (scaldabagno, ventilazione, aria condizionata) ?
Si ☐ No ☐ Non ricordo ☐

Ci sono state interruzioni nella fornitura d'acqua nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi?
Si ☐ No ☐ Non ricordo ☐

Ci sono lavori in corso vicino a casa sua?
Si ☐ No ☐ Non so ☐

Se si di che tipo (costruzione o scavi) _____
A quale distanza approssimativamente _____

La sua casa è situata vicino a una fabbrica che emette pennacchi di fumo ?
Si ☐ No ☐ Non so ☐
Se si, che fabbrica è: _____
Ci sono torri di raffreddamento vicino a casa sua:
Si ☐ No ☐ Non so ☐
Se si, dove : _____
Commenti : _____

Abitudini sociali
Luoghi frequentati nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi:

	Si	No	Non ricordo	Indirizzo e data
Teatro	☐	☐	☐	_____
Fontane, getti d'acqua	☐	☐	☐	_____
Parchi acquatici	☐	☐	☐	_____
Cinema	☐	☐	☐	_____
Ristoranti	☐	☐	☐	_____
Negozi, supermercati	☐	☐	☐	_____
Palestre	☐	☐	☐	_____
Piscine	☐	☐	☐	_____
Centro anziani	☐	☐	☐	_____
Altro	☐	☐	☐	_____

Commenti:
_____

Ha l'abitudine di passeggiare/camminare? Si☐ No ☐

Qual'è il suo percorso abituale?
_____

Ha fatto lavori di giardinaggio o di scavo nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi?
Si ☐ No ☐ Non ricordo ☐
Ha innaffiato il giardino Si ☐ No ☐ Non ricordo ☐
Ha utilizzato acqua sotto pressione Si ☐ No ☐ Non ricordo ☐
Dove ha fatto la spesa nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi?
_____
_____

Ci sono altre attività sociali o giornaliere a cui ha partecipato nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi?
Si ☐ No ☐ Non ricordo ☐
_____
_____

Viaggi, luogo di residenza
Ha effettuato qualche viaggio nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi?
Si ☐ No ☐ Non ricordo ☐
Se si, dove, con chi e in quale data:
_____

Ha soggiornato in albergo/campeggio nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi?
Si ☐ No ☐ Non ricordo ☐
Se si, indicare il nome della struttura e la data di soggiorno :
_____
Ha soggiornato a casa di qualcuno nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi?
Si ☐ No ☐ Non ricordo ☐
Se si, dove e quando :
_____
_____

Altri commenti:
_____
_____
_____