

## AUTONOME DI TRENTO E BOLZANO

DOCUMENTO 4 aprile 2000

### Linee-guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi.

Allegato

#### INTRODUZIONE

La legionellosi e' una malattia infettiva grave e a letalita' elevata.

L'osservazione di recenti casi di legionellosi in nosocomi italiani e la notifica di polmoniti da Legionella in turisti che hanno soggiornato in alberghi e villaggi del nostro Paese pone la Sanita' pubblica di fronte al problema della prevenzione comunitaria e nosocomiale delle infezioni da batteri del genere Legionella.

Con le "Linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi" si intende fornire uno strumento operativo per facilitare l'accertamento dei casi e per individuare le scelte strategiche sulle misure preventive e di controllo.

Nelle linee guida viene anche ricompresa la revisione della circolare 400.2/9/5708 del 29 dicembre 1993 "Sorveglianza delle Legionellosi" per l'aggiornamento della scheda di sorveglianza.

#### 1.0 - EPIDEMIOLOGIA

"Legionellosi" e' la definizione di tutte le forme morbose causate da batteri gram-negativi aerobi del genere Legionella. Essa si puo' manifestare sia in forma di polmonite, sia in forma febbrile extrapolmonare o in forma subclinica. La specie piu' frequentemente coinvolta in casi umani e' Legionella pneumophila anche se altre specie sono state isolate da pazienti con polmonite.

#### 1.1 - Siti epidemici e condizioni naturali favorevoli.

L'unico serbatoio naturale di Legionella e' l'ambiente. Dal serbatoio naturale (ambienti lacustri, corsi d'acqua, acque termali, ecc.) il germe passa nei siti che costituiscono il serbatoio artificiale (acqua condottata cittadina, impianti idrici dei singoli edifici, piscine ecc.).

Il microrganismo e' ubiquitario e la malattia puo' 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. I casi di polmonite da Legionella si manifestano prevalentemente nei mesi estivo-autunnali per quelli di origine comunitaria, mentre quelli di origine nosocomiale non presentano una particolare stagionalita'.

#### 1.2 - Rischio di infezione.

Fattori predisponenti la malattia sono l'eta' avanzata, il fumo di sigaretta, la presenza di malattie croniche, l'immunodeficienza. Il rischio di acquisizione della malattia e' principalmente correlato alla suscettibilita' individuale del soggetto esposto e al grado di intensita' dell'esposizione, rappresentato dalla quantita' di legionelle presenti e dal tempo di esposizione. Sono importanti inoltre la virulenza e la carica infettante dei singoli ceppi di legionelle, che, interagendo con la suscettibilita' dell'ospite, determinano l'espressione clinica dell'infezione.

La virulenza delle legionelle potrebbe essere aumentata dalla replicazione del microrganismo nelle amebe presenti nell'ambiente acquoso.

Per quanto siano state descritte 42 diverse specie di Legionella, non tutte sono state associate alla malattia nell'uomo. Legionella

pneumophila e' la specie piu' frequentemente rilevata nei casi diagnosticati.

Anche se e' difficile stabilire quale sia la dose infettante per l'uomo, si ritiene comunemente che concentrazioni di legionelle comprese tra 10<sup>2</sup> e 10<sup>4</sup>/L siano idonee a provocare un caso di infezione l'anno, mentre cariche comprese tra 10<sup>4</sup> e 10<sup>6</sup>/L possono provocare casi sporadici (Tabella 1).

Tabella 1. Fattori di rischio e malattie di base che favoriscono l'acquisizione di una polmonite da Legionella

Fattori di rischio	Malattie di base
Età avanzata	Broncopneumopatia cronica ostruttiva
Sesso maschile	Immunosoppressione:
Alcoolismo	Trapianto d'organo
Tabagismo	Terapia corticosteroidica
Sonda nasogastrica, alimentazione con sondino	Neoplasie e interventi chirurgici ORL
Inalazione di acqua non sterile	Insufficienza renale terminale
Presenza di Legionella in più del 30% dei campioni d'acqua analizzati o di concentrazioni di Legionella 10 elevato a 3 /L in una determinata struttura	Insufficienza cardiaca
Presenza di torri di raffreddamento degli impianti di condizionamento nell'area circostante	Diabete

### 1.3 - Modalità di trasmissione.

La legionellosi viene normalmente acquisita per via respiratoria mediante inalazione di aerosol contenente legionelle, 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. Più piccole sono le dimensioni delle gocce più queste sono pericolose. Gocce di diametro inferiore a 5 μm arrivano più facilmente alle basse vie respiratorie.

Mentre la maggior parte dei primi casi di legionellosi sono stati attribuiti a sostanze aerodisperse contenenti batteri provenienti da torri di raffreddamento o condensatori evaporativi o sezioni di umidificazione delle unità di trattamento dell'aria, le infezioni più recenti sono risultate causate anche dalla contaminazione di impianti di acqua potabile, apparecchi sanitari, fontane e umidificatori ultrasonici (Tabella 2).

I principali sistemi generanti aerosol che sono stati associati alla trasmissione della malattia comprendono gli impianti idrici, gli impianti di climatizzazione dell'aria (torri di raffreddamento, sistemi di ventilazione e condizionamento dell'aria, ecc.), le apparecchiature per la terapia respiratoria assistita e gli idromassaggi.

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

Sono stati inoltre segnalati in letteratura casi di legionellosi acquisiti mediante aspirazione o microaspirazione di acqua

contaminata e casi di legionellosi acquisita attraverso ferita.

Non e' mai stata dimostrata la trasmissione interumana.

Tabella 2. Principali modalita' e sorgenti di trasmissione della Legionella sp.

Modalità	Fonte
Inalazione di aerosol	Contaminazione dell'impianto idrico Torri di raffreddamento degli impianti di condizionamento Umidificazione centralizzata degli impianti Apparecchi per aerosol e ossigenoterapia
Aspirazione	Sonda nasogastrica Colonizzazione dell'orofaringe
Respirazione assistita	Contaminazione delle apparecchiature per la respirazione assistita

#### 1.4 - Frequenza della malattia.

L'adozione di misure preventive, anche se costose, appare giustificata poiche' la malattia viene diagnosticata raramente. Cio' dipende probabilmente da un mancato accertamento di tutti i casi, per cui la frequenza della malattia puo' essere sottostimata.

Secondo alcuni autori le legionelle sono responsabili dell'1-5% dei casi totali di polmonite comunitaria e del 3-20% di tutte le polmoniti nosocomiali. Applicando queste percentuali al numero totale di polmoniti nosocomiali che si verificano ogni anno in Italia si otterrebbe un numero di casi di malattia almeno dieci volte superiore a quello attualmente notificato.

La letalita' della legionellosi e' maggiore per le infezioni nosocomiali che per quelle comunitarie. La letalita' totale e' del 5-15%, mentre nei casi nosocomiali e' compresa tra il 30 e il 50%.

In pazienti in condizioni cliniche scadute o trattati tardivamente puo' arrivare al 70-80%.

Il tasso medio europeo di incidenza, nel 1998, delle polmoniti da Legionella e' stato di 4,3 casi per milione di abitanti. L'Italia si colloca ben al di sotto della media con un tasso d'incidenza di 1,8 casi per milione d'abitanti.

Numerosi studi dimostrano che la legionellosi e' stata sottostimata, di conseguenza il tasso d'incidenza potrebbe essere molto vicino al tasso di incidenza piu' alto dei Paesi europei.

In Italia negli ultimi anni sono stati notificati mediamente un centinaio di casi di legionellosi ogni anno; la maggioranza di essi viene notificata da poche regioni del nord e del centro Italia, mentre solo un numero molto limitato di casi viene segnalato dalle regioni dell'Italia meridionale.

I casi di infezione nosocomiale rappresentano mediamente il 20-30% del totale.

Il 10-15% dei pazienti dichiara di aver pernottato almeno una notte in luoghi diversi dall'abitazione abituale (alberghi, campeggi, ecc.) nelle due settimane precedenti l'insorgenza dei sintomi, mentre il rimanente 50-60% dei casi non riferisce un fattore di rischio noto a cui far risalire la malattia.

Circa il 60% dei casi presenta altre patologie concomitanti, prevalentemente di tipo cronico-degenerativo e di tipo neoplastico.

La sierologia e' il metodo diagnostico piu' utilizzato e Legionella pneumophila sierogruppo 1 e' responsabile dell'85% circa dei casi.

#### 2.0 - CLINICA

L'infezione da legionelle puo' dar luogo a 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 senza interessamento polmonare,

simil-influenzale, 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 Malattia dei Legionari, dopo un periodo di incubazione variabile da 2 a 10 giorni (in media 5-6 giorni), si manifesta con interessamento polmonare a carattere lobare clinicamente di discreta o notevole gravita', con o senza manifestazioni extrapolmonari.

Il quadro polmonare ha esordio brusco con malessere, cefalea, febbre e osteoartralgie, tosse lieve, non produttiva, che si accentua con il comparire dei sintomi respiratori. All'esame obiettivo del torace si apprezzano aree di addensamento parenchimale mono o bilaterali, con ipofonesi e presenza di rantoli crepitanti. Il reperto radiologico non e' patognomonico.

A volte possono essere presenti sintomi gastrointestinali, neurologici e cardiaci; alterazioni dello stato mentale sono comuni ma non lo sono i segni di meningismo. Il paziente affetto da legionellosi, che manifesti confusione mentale, presenta in genere anche uno o piu' dei seguenti 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 ed insufficienza renale.

Di seguito sono riportate le manifestazioni extrapolmonari classificate in base alla localizzazione e alla frequenza con cui si verificano.

Tabella 3. Manifestazioni extrapolmonari della Malattia dei Legionari

Manifestazioni extrapolmonari comuni		Manifestazioni extrapolmonari rare
Neurologiche:	Confusione	Insomnia
	Disorientamento	Allucinazioni
	Letargia	Delirio
		Atassia
		Ascesso cerebrale
		Deficit neurologici focali
		Amnesia retrograda
		Convulsioni
		Neuropatia periferica
		Corea
		Encefalomielite
		Vertigini
Gastrointestinali:		
	Nausea	Epatomegalia
	Vomito	Peritonite

Feci non formate/Diarrea	Ascesso perirettale
Dolore addominale	Ascesso appendicolare
	Pancreatite
	Colite
Renali:	
Proteinuria	Insufficienza renale
Ematuria	Insufficienza renale mioglobinurica
	Nefrite acuta tubulointerstiziale
	Ascesso renale
	Glomerulonefrite
Testa/occhi/orecchi	
Nessuna	Sinusite
Cardiache	
Nessuna	Miocardite
	Pericardite
	Effusione pericardica
	Torsione della punta
Tessuti molli/pelle	
Nessuna	Cellulite
	Ascesso cutaneo
	Infezione di ferite

La polmonite da Legionella non ha caratteristiche cliniche che permettano di distinguerla da altre forme atipiche o batteriche di polmonite. Tuttavia, le modalita' di coinvolgimento degli organi extrapolmonari e' specifica per la legionellosi e una diagnosi clinica presuntiva puo' essere fatta sulla base di una corretta associazione di segni e sintomi chiave.

Per semplicita', nel testo che segue, sara' usato il termine "legionellosi" per indicare tutte le forme morbose causate da microrganismi del genere Legionella.

### 3.0 - DIAGNOSI DI LABORATORIO

La diagnosi di laboratorio della legionellosi deve essere considerata complemento indispensabile alle procedure diagnostiche cliniche. L'indagine laboratoristica deve essere attuata possibilmente prima che i risultati possano essere influenzati dalla terapia, e deve essere richiesta specificamente.

Poiche' la legionellosi e' una malattia a bassa prevalenza, la specificita' delle prove di laboratorio deve essere prossima al 99,9% per permettere una diagnosi attendibile dei casi sporadici. La complessita' della diagnosi di laboratorio consiste inoltre nella difficolta' di isolare e identificare il germe in tempi relativamente

brevi, e nella comparsa sovente molto tardiva degli anticorpi, per cui talvolta e' possibile fare una diagnosi solo retrospettivamente.

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

Il metodo diagnostico di elezione e' l'isolamento e l'identificazione del microrganismo. Tuttavia esso richiede terreni di coltura speciali (la legionella non cresce sui terreni di uso comune) e tempi di crescita relativamente lunghi (4-10 giorni). La prova dovrebbe essere eseguita sistematicamente sulle secrezioni respiratorie ed eventualmente su parenchima polmonare di pazienti con polmonite atipica interstiziale. Una emocoltura negativa, seminata successivamente su terreno appropriato per Legionella, puo' dar luogo all'isolamento del microrganismo.

L'isolamento da campioni clinici e' estremamente importante, sia perche' e' il criterio diagnostico piu' specifico, sia perche' permette lo studio comparativo con ceppi di Legionella isolati dall'ambiente presumibilmente associati all'infezione al fine di individuare la fonte dell'infezione stessa.

La prova dell'antigenuria (presenza di antigene solubile nelle urine) ha il vantaggio che e' piu' facile ottenere un campione di urine che un campione di espettorato adeguato (poiche' i pazienti presentano una tosse non produttiva) o di broncoaspirato/lavaggio. Inoltre, si positivizza precocemente e, contrariamente alla coltura, puo' dare risultati positivi anche per sessanta giorni, e talvolta oltre, in modo intermittente, anche in corso di terapia antibiotica. Tuttavia proprio per questo motivo, puo' risultare difficile distinguere tra infezione acuta, fase di convalescenza, o infezione pregressa.

Il test per la rilevazione dell'antigene urinario evidenzia solo gli antigeni di Legionella pneumophila sierogruppo 1. Quindi, benché la sensibilita' di tale test sia dell'80-95% per infezioni dovute a tale microrganismo, la sensibilita' globale per tutte le cause di legionellosi oscilla tra il 65 e il 75%.

I metodi sierologici sono utili per indagini epidemiologiche ma sono meno validi per quelle cliniche, data la comparsa talvolta tardiva (anche tre-sei settimane) degli anticorpi specifici a livelli significativi e della necessita' di controllare un campione di siero in fase di convalescenza. L'esistenza di reattivita' crociata tra legionelle ed altri microrganismi, e la difficolta' di distinguere tra infezione in atto o infezione pregressa in caso di campione singolo di siero o di titolo anticorpale costante (infatti occasionalmente le IgM possono persistere a lungo nel siero dei pazienti con legionellosi) rende la conferma diagnostica piu' complessa. Un risultato positivo su un singolo siero ha un valore diagnostico presuntivo. Il metodo sierologico ha un valore predittivo positivo (proporzione di realmente malati tra i positivi al test) piuttosto basso.

L'evidenziazione delle legionelle nei campioni clinici per mezzo dell'immunofluorescenza, pur permettendo di confermare la diagnosi di polmonite da Legionella entro poche ore, ha una validita' inferiore al metodo colturale. La tecnica richiede una certa esperienza nella lettura del preparato, e dipende dal metodo di preparazione degli antisieri e dalle dimensioni del preparato esaminato.

La tecnica di ibridizzazione degli acidi nucleici, utilizzando sonde di DNA che individuano molecole di DNA o di rRNA, permette una diagnosi precoce ed una risposta entro poche ore. Il metodo tuttavia risente delle condizioni sperimentali e del tipo di campione e deve essere ulteriormente validato.

L'amplificazione del DNA mediante reazione polimerasica a catena

(PCR) e' stata applicata per ricercare le legionelle o parti di esse nel fluido del lavaggio bronco-alveolare, nel siero e nelle urine, ma negli ultimi casi la metodica e' ancora allo stato sperimentale.

Poiche' le varie prove di laboratorio sono complementari tra loro, in caso di sospetta legionellosi occorre eseguirne piu' di una. Inoltre, poiche' nessuna delle prove ha una sensibilita' del 100%, una diagnosi di legionellosi non puo' essere esclusa anche se una o piu' prove di laboratorio danno risultato negativo.

Tabella 4: Metodi diagnostici per la legionellosi

Metodo	Specificità (%)	Sensibilità (%)
Coltura	99,8*-100	80
Evidenza dell'antigene nelle urine***	95-99	80-95
Sierologia: aumento del titolo anticorpale	96-99	70-80
Sierologia: titolo unico**	50-80	70-80
Evidenza del microrganismo con immunofluorescenza	96-99	25-75

\* Limitazione dovuta alla possibilita' di contaminazione esterna dei campioni.

\*\* Titolo 256 in siero singolo. Un titolo di 128 in siero singolo in paziente con polmonite e' considerato presuntivo di infezione.

\*\*\*Metodo utile per Legionella pneumophila sierogruppo 1.

#### 4.0 - TERAPIA

La terapia dei soggetti con legionellosi si basa essenzialmente sul trattamento con antibiotici attivi contro Legionella, oltre alle usuali misure di supporto respiratorio o sistemico. Poiche' questo batterio ha un habitat intracellulare, nella scelta di un antibiotico attivo, particolare peso avra' la capacita' del farmaco di penetrare nella cellula fagocitaria ed ivi raggiungere sufficiente concentrazione. Pertanto, la scelta terapeutica dovrebbe basarsi sulla concentrazione e sulla persistenza dell'antibiotico nel parenchima polmonare. E' da rilevare che la Febbre di Pontiac ha una evoluzione benigna anche in assenza di specifico trattamento chemioterapico.

Su queste basi, antibiotici delle classi dei macrolidi si sono rivelati i piu' efficaci e risolutivi nella pratica clinica. Storicamente, il capostipite di questa classe, l'eritromicina, e' stato il farmaco piu' impiegato, in genere con somministrazione per due-tre settimane, ad una dose di attacco di 1 g endovena ogni 6 ore per 3-5 giorni, seguita da 500 mg/6h per os. Oggi si tende a preferire i nuovi macrolidi quali la claritromicina e l'azitromicina, a motivo di una piu' potente azione battericida intracellulare e minori effetti collaterali. Altri antibiotici molto attivi sono i nuovi fluorochinoloni, ad esempio la levofloxacina. In particolare, nei soggetti fortemente immunocompromessi, una associazione fra un fluorochinolone e l'azitromicina o la claritromicina, e' preferibile per l'elevato sinergismo d'azione intra ed extracellulare di questi due chemioterapici.

Altri antibiotici attivi contro la legionella sono le tetracicline (in particolare la doxiciclina per via endovenosa), la rifampicina, l'associazione fra trimetoprim e sulfametossazolo, nonche' l'imipenem. Tuttavia, tutti questi farmaci dovrebbero essere usati solo quando non sia possibile, per motivi di resistenza, di

tossicità o di allergie individuali, l'uso dei macrolidi e/o dei fluorochinoloni.

Come per tutte le altre terapie antiinfettive, la scelta della terapia più opportuna deve anche valutare la gravità dell'infezione, l'eventuale antibiotico-resistenza della Legionella isolata, la presenza di disfunzioni organiche, in particolare epatogastriche, ed i costi.

#### 5.0 - SORVEGLIANZA

I principali obiettivi della sorveglianza della legionellosi sono:

monitorare la frequenza di legionellosi sia dal punto epidemiologico che clinico-nosologico, 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.

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 spp da materiale organico (secrezioni respiratorie, broncolavaggio, tessuto polmonare, essudato pleurico, essudato pericardico, sangue);

2) aumento di almeno 4 volte del titolo anticorpale specifico verso Legionella pneumophila sierogruppo 1, rilevato sierologicamente mediante immunofluorescenza o microagglutinazione tra due sieri prelevati a distanza di almeno dieci giorni;

3) riconoscimento dell'antigene specifico solubile nelle urine.

Caso presunto.

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) aumento di almeno 4 volte del titolo anticorpale specifico, relativo a sierogruppi o specie diverse da Legionella pneumophila sierogruppo 1;

2) positività all'immunofluorescenza diretta con anticorpi monoclonali o policlonali di materiale patologico;

3) singolo titolo anticorpale elevato (1:256) verso Legionella pneumophila sierogruppo 1.

Focolaio epidemico.

Qualora due o più casi siano riscontrati come riconducibili ad una medesima esposizione nell'arco di sei mesi.

#### 5.1 - Sistema di notifica.

Per i casi di legionellosi è prevista la notifica obbligatoria in classe II, decreto ministeriale 15 dicembre 1990.

Il medico segnalatore deve comunicare il caso, entro 48 ore dall'osservazione, al Servizio di igiene e sanità pubblica dell'azienda USSL, il quale procede, previa validazione della diagnosi, all'invio del modello 15 alla regione.

La regione provvederà all'invio della notifica individuale al Ministero della sanità ed all'ISTAT.

Il flusso informativo delle schede di notifica si articola come illustrato nella figura 1. - ommis.

L'invio della notifica con il mod. 15, classe II non sostituisce l'invio della scheda di sorveglianza secondo quanto previsto dalla Circolare 400.2/199/5708 del 29 dicembre 1993, di seguito illustrata.

E' prevista, inoltre, la notifica obbligatoria dei focolai di legionellosi in classe IV. Il medico segnalatore deve comunicare il focolaio, entro 24 ore al SISP della ASL di diagnosi, il quale provvede all'invio del modello 15, classe IV (come da nota 400.2/26N/3749 del 31 luglio 1991), alla regione, al Ministero della Sanita', all'Istituto superiore di Sanita' ed all'ISTAT.

I dati relativi ai casi notificati di legionellosi sono pubblicati annualmente nel Bollettino epidemiologico del Ministero della Sanita', stratificati per regione, provincia, eta' e sesso.

#### 5.2 - Sistema di sorveglianza nazionale.

Il medico che pone la diagnosi deve compilare la scheda di sorveglianza (Circolare 400.2/199/5708 del 29 dicembre 1993) che deve essere tempestivamente inviata al SISP dell'azienda USSSL - a cura della Direzione sanitaria dell'Ospedale in cui e' stata posta la diagnosi - ed all'I.S.S. - a cura o della Direzione sanitaria dell'Ospedale in cui e' stata posta la diagnosi o del SISP dell'Azienda U.S.S.L. di competenza -. Devono essere inviati al Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica dell'ISS, che e' il laboratorio nazionale di riferimento per la legionellosi, i ceppi clinici sospetti di Legionella eventualmente isolati, per la tipizzazione o la conferma. L'invio o meno dei ceppi di origine ambientale, in casi speciali, dovra' essere concordato con l'I.S.S.

Il SISP dell'azienda USSSL di diagnosi provvede alla trasmissione mensile delle schede alla regione, facendo riferimento all'indagine epidemiologica e dopo opportuna validazione dei casi secondo i criteri espressi nel paragrafo "Definizione di caso".

L'invio della scheda di sorveglianza non sostituisce l'ottemperanza dell'obbligo di notifica secondo quanto disposto dal succitato decreto ministeriale 15 dicembre 1990.

Poiche' l'invio della scheda all'ISS deve essere tempestivo, al fine di poter attuare tutti gli interventi preventivi necessari, il successivo invio della scheda da parte della regione all'ISS e' previsto quale completamento delle informazioni che non e' stato possibile registrare all'inizio dell'evento.

Nel caso in cui l'azienda USSSL di diagnosi non coincida con quella di domicilio abituale del caso, il SISP dell'azienda USSSL di diagnosi segnala il caso, con tutte le informazioni necessarie all'eventuale sorveglianza dei co-esposti, al SISP dell'azienda USSSL di domicilio abituale. Il SISP dell'azienda USSSL di diagnosi provvede alla segnalazione del caso anche al SISP dell'azienda USSSL di residenza anagrafica, qualora diversa da quella di diagnosi e da quella di domicilio abituale.

I dati contenuti nel questionario (anagrafici, statistico-epidemiologici, clinici) vengono elaborati periodicamente e annualmente viene redatto un rapporto informativo sui risultati della sorveglianza (Notiziario ISS).

Ai fini di una efficace sorveglianza sul territorio nazionale e' prevista la costruzione di una rete di Laboratori di riferimento individuati dalle regioni, collegati organicamente al Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica dell'ISS, sulla base delle riconosciute competenze nel settore e dopo il completamento di un programma di controllo di qualita' coordinato dall'ISS stesso.

#### 5.3 - Sorveglianza internazionale della legionellosi nei viaggiatori.

Parallelamente al sistema di sorveglianza dei casi italiani, nell'ambito dell'European Working Group for Legionella Infections

(EWGLI) esiste un programma di sorveglianza internazionale delle legionellosi nei viaggiatori iniziato nel 1986 e coordinato fino al 1993 dal National Bacteriology Laboratory di Stoccolma e successivamente dal Public Health Laboratory Service (PHLS), Communicable Disease Surveillance Centre (CDSC) di Londra.

Tale programma, al quale aderisce anche l'Italia, raccoglie informazioni relative ai casi di legionellosi associati ai viaggi che si verificano nei cittadini di 30 Paesi europei partecipanti al programma.

Lo EWGLI segnala all'Istituto superiore di sanita' (Laboratorio di batteriologia e micologia medica) 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 laboratorio di epidemiologia e biostatistica dell'ISS provvede, a sua volta, a segnalare i casi al Ministero della sanita', Dipartimento della prevenzione, Ufficio III-Malattie infettive e profilassi internazionale, per i provvedimenti di competenza, e alle competenti autorità delle regioni coinvolte, al fine di attivare l'indagine ambientale ed epidemiologica locale.

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

#### 6.0 - L'INDAGINE EPIDEMIOLOGICA

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

Per avere un quadro globale della situazione e' fondamentale disporre per ciascun paziente affetto da legionellosi di informazioni precise su una eventuale esposizione a rischio nelle due settimane precedenti l'insorgenza dei sintomi.

L'anamnesi deve approfondire almeno i punti seguenti:

- professione, contatto con acqua nebulizzata;
- luogo di soggiorno: ospedale, casa, casa di cura, alberghi;
- bagni termali, piscine, idromassaggi;
- partecipazione a crociere, fiere, esposizioni;
- terapia respiratoria, trattamenti odontoiatrici;
- soggiorno in ambienti climatizzati.

#### 6.1 - Casi isolati.

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

1. Conferma della diagnosi.

2. Ricerca dell'esposizione mediante anamnesi mirata: frequentazione di luoghi a rischio nelle due settimane precedenti l'insorgenza dei sintomi.

3. 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 e' sottoposto a notifica internazionale (European Working Group for Legionella Infections, EWGLI).

4. Aumentata vigilanza verso la segnalazione ripetuta di situazioni simili.

5. Un caso confermato per il quale si sospetta un'infezione di origine nosocomiale, professionale o termale, richiede indagini supplementari. Ricerca di altri casi, ispezione dei luoghi, ricerca di Legionella nell'acqua.

6. In alcune situazioni particolari (ad esempio a casa di un paziente immunodepresso affetto da legionellosi) sono particolarmente raccomandati dei controlli sulla rete idrica.

#### 6.2 - Casi raggruppati.

In presenza di 2 o più casi di supposta origine comune, e' 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 necessari un'indagine ambientale e uno studio epidemiologico-analitico (coorte, caso-controllo).

1. Conferma di laboratorio della diagnosi. Si raccomanda, quando possibile, coltura delle secrezioni bronchiali o dell'espettorato e tipizzazione del germe in causa.

2. Notifica immediata alle autorità sanitarie e all'ISS (da completare in seguito con i risultati dell'indagine epidemiologica).

3. Ricerca di altri possibili casi nei coesposti alla stessa fonte e conferma della diagnosi.

4. Descrizione della distribuzione nel tempo e nello spazio dei casi confermati, dei casi possibili e eventualmente dei casi dubbi. Rappresentazione grafica della curva epidemica.

5. Ricerca delle caratteristiche comuni: interviste sul luogo di soggiorno e attività svolte durante le due settimane precedenti la malattia.

6. Formulazione di ipotesi riguardo all'origine dell'infezione.

7. 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, se necessario, gli isolati a un laboratorio di riferimento (regionale o centrale).

8. Eventualmente, ricerca della fonte d'infezione con un'indagine epidemiologico-analitica.

#### 7.0 - MISURE DI PREVENZIONE E CONTROLLO NEI SISTEMI IMPIANTISTICI

I sistemi di riscaldamento, ventilazione e condizionamento dell'aria e i loro componenti, così come pure l'acqua potabile e le attrezzature sanitarie, possono favorire e amplificare la diffusione di sostanze aerodisperse; tra queste di particolare pericolosità risulta essere Legionella sp.

I più comuni impianti generatori di aerosol associati ad edifici comprendono torri di raffreddamento, condensatori evaporativi, diffusori di docce, aeratori di rubinetti, vasche per idromassaggio, nebulizzatori ed umidificatori.

I primi casi di legionellosi sono stati in prevalenza attribuiti a sostanze aerodisperse contenenti batteri provenienti da torri di raffreddamento o condensatori evaporativi o sezioni di umidificazione delle unità di trattamento dell'aria. Diversamente le infezioni sono risultate causate anche dalla contaminazione delle reti di distribuzione dell'acqua, apparecchi sanitari, attrezzature per l'ossigenoterapia, fontane e umidificatori ultrasonici.

L'aumento moderato della temperatura dell'acqua, rispetto a quella naturale, rappresenta uno dei principali fattori che favoriscono la crescita del batterio e la contaminazione ambientale. Altri fattori sono: il pH, la presenza di fonti di nutrimento, la presenza di altre forme di microrganismi.

La sopravvivenza della legionella è legata anche a fattori ambientali: l'aria sufficientemente umida (umidità relativa superiore al 65%), la temperatura non eccessivamente alta, e la radiazione solare non molto elevata.

Le procedure che contrastano la moltiplicazione e la diffusione di Legionella devono essere attentamente considerate e messe in atto durante le fasi di progettazione, di installazione, di funzionamento e di manutenzione. Per quanto tali misure non garantiscano che un sistema o un componente siano privi di legionelle, esse contribuiscono a diminuire la possibilità di inquinamento batterico grave.

7.1 - Strategie di prevenzione nei sistemi impiantistici.

7.1.1 - Strategie per prevenire la colonizzazione degli impianti.

Evitare di installare tubazioni con tratti terminali ciechi e senza circolazione dell'acqua.

Evitare la formazione di ristagni d'acqua.

Provvedere ad effettuare la pulizia periodica degli impianti.

Limitare la possibilità di nicchie biologiche per i

microrganismi attraverso la pulizia degli impianti, la prevenzione e la rimozione dei sedimenti dai serbatoi d'acqua calda, bacini di raffreddamento e altre misure igieniche.

Mantenere efficienti i separatori di gocce montati a valle delle sezioni di umidificazione.

Controllare lo stato di efficienza dei filtri ed eliminare l'eventuale presenza di gocce d'acqua sulle loro superfici.

7.1.2 - Strategie per prevenire la moltiplicazione batterica.

Controllare, ove possibile, la temperatura dell'acqua in modo da evitare l'intervallo critico per la proliferazione dei batteri (25-55 °C).

Utilizzare trattamenti biocidi al fine di ostacolare la crescita di alghe, protozoi e altri batteri che possono costituire nutrimento per la legionella.

Provvedere ad un efficace programma di trattamento dell'acqua, capace di prevenire la corrosione e la formazione di film biologico, che potrebbe contenere anche legionelle.

7.2 - Misure di prevenzione a lungo termine.

1. Ottenimento di informazioni preliminari circa il progetto, il funzionamento e la manutenzione dell'impianto idrico.

2. Progettare l'impianto in modo da avere ben separate le tubature dell'acqua calda da quelle dell'acqua fredda.

3. Programmazione di visite ispettive sull'impianto idrico al fine di: verificare possibili stagnazioni d'acqua, intersezioni tra sistemi di acqua potabile e industriale, effettuare misurazioni delle temperature di accumulo e di mandata dell'acqua calda ad uso sanitario.

4. Programmazione di visite ispettive sull'impianto di climatizzazione al fine di esaminare lo stato degli umidificatori, delle torri evaporative, l'ubicazione delle prese di aria esterna e lo stato delle canalizzazioni.

5. Controllo del programma di manutenzione.

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

prendere in esame la possibilita' di drenare efficacemente i fluidi usati per la pulizia;

evitare di collocare l'isolamento termico all'interno delle condotte, considerata la difficolta' di pulire in modo efficace l'isolamento stesso;

dotare (a monte e 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;

utilizzare materiali sufficientemente solidi per i condotti flessibili, tali da permetterne la pulizia meccanica;

utilizzare terminali (bocchette, anemostati) smontabili.

Durante l'esercizio dell'impianto e' importante eseguire controlli periodici per rilevare la presenza o meno di sporcizia. Nel caso, poi, di un intervento di pulizia, occorre assicurarsi successivamente che le sostanze usate siano rimosse completamente dal sistema.

7.2.1 - 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 piu' elevati. Inoltre si raccomanda di osservare le distanze consigliate dai costruttori tra tali dispositivi e gli umidificatori.

7.2.2 - 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 verificare la distanza tra dette prese e possibili sorgenti di inquinanti (compresa l'espulsione dell'aria).

#### 7.2.3 - 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 EU71) a monte delle unità di trattamento dell'aria e ulteriori filtri di classe EU8/199 a valle di dette unità e comunque a valle degli eventuali silenziatori. Sui sistemi di ripresa dell'aria dovrebbero essere installati filtri almeno di classe EU7. Si raccomanda, ovviamente, una regolare pulizia e ricambio dei filtri.

#### 7.2.4 - Batterie di scambio termico.

Le batterie possono dar luogo a emissione di odori a causa delle incrostazioni che si formano sulle superfici interne, soprattutto nel caso di batterie calde. Per minimizzare tali inconvenienti, soprattutto nel caso di temperature elevate, occorre effettuare una pulizia frequente mediante spazzolatura o aspirazione. Nel caso di batterie di raffreddamento, le superfici alettate ed in particolare le bacinelle di raccolta della condensa costituiscono i luoghi dove maggiormente proliferano microrganismi e muffe. Risulta pertanto necessario installare bacinelle inclinate in modo da evitare ristagni, e realizzarle con materiali anticorrosivi per agevolare la pulizia.

#### 7.2.5 - 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.

#### 7.2.6 - Umidificatori adiabatici.

La qualità dell'acqua spruzzata nelle sezioni di umidificazione adiabatica deve essere periodicamente controllata; l'incremento della carica batterica deve essere prevenuta mediante sistemi di sterilizzazione oppure mediante periodica pulizia dei sistemi. La carica batterica totale dell'acqua circolante non deve eccedere il valore standard di 106 CFU/L con una temperatura di incubazione di 20°C e 36°C. La presenza di legionella negli umidificatori è sicuramente evitata se la carica batterica non eccede 103 CFU/L.

#### 7.2.7 - Torri evaporative.

La qualità dell'acqua spruzzata nelle torri evaporative deve essere periodicamente controllata; occorre inoltre pulire e drenare il sistema:

- prima del collaudo;
- alla fine della stagione di raffreddamento o prima di un lungo periodo di inattività;
- all'inizio della stagione di raffreddamento o dopo un lungo periodo di inattività;
- almeno due volte l'anno.

Sono raccomandate analisi microbiologiche periodiche. La carica batterica totale massima ammissibile è di 107 CFU/L; l'uso di biocidi non deve essere comunque continuativo.

1) La classificazione Eurovent EU prevede 14 classi di filtrazione con efficienze via via crescenti fino a EU14 (filtri per sale operatorie e camere bianche).

7.2.8 - Per quanto riguarda gli impianti di condizionamento dell'aria si indicano, di seguito, le misure più importanti ai fini della prevenzione.

1. Progettare le torri di raffreddamento e posizionare le prese d'aria degli impianti di condizionamento in modo tale da evitare che l'aria di scarico proveniente dalle torri e dai condensatori

evaporativi entri negli edifici.

2. Mantenere efficienti i separatori di gocce sulle torri di raffreddamento e sui condensatori evaporativi.

Assicurarsi che i filtri per l'aria esterna siano asciutti. Gocce d'acqua e condensa sui filtri forniscono un ambiente ideale per la diffusione dei batteri negli ambienti condizionati. I filtri dovrebbero essere puliti o sostituiti secondo le indicazioni fornite dai costruttori.

### 7.3 - Canalizzazioni.

Per consentire una efficace pulizia delle superfici interne delle canalizzazioni, evitandone il danneggiamento dei rivestimenti, si puo' impiegare una tecnica particolare che fa uso di una testa ad ugello con fori asimmetrici, posta all'estremita' di una tubazione flessibile che viene introdotta nelle aperture, appositamente predisposte. Da questa tubazione fuoriesce aria compressa in grossi quantitativi (fino a 300 m<sup>3</sup>/h). L'elevata portata d'aria crea una sorta di lama d'aria che provoca il distacco della sporcizia dalle superfici interne della canalizzazione; l'asimmetria dei fori ne provoca poi una rotazione e quindi l'avanzamento della tubazione per tutta la sua lunghezza (fino a 30 m).

### 7.4 - Istituzione del registro degli interventi di manutenzione.

E' opportuno istituire il Registro per la documentazione degli interventi di manutenzione, ordinari e straordinari, sugli impianti idrici e di climatizzazione.

## 8.0 - METODI DI PREVENZIONE E CONTROLLO DELLA CONTAMINAZIONE DEL SISTEMA IDRICO

Si riporta di seguito una rassegna delle metodiche attualmente possibili che andranno adottate previa valutazione del singolo impianto, del sistema idrico e dell'ambiente nel quale si opera. Le misure di lotta a lungo termine sono comunque legate ad una buona progettazione degli impianti, in particolare negli ospedali, negli stabilimenti termali e nei ricoveri per anziani.

### 8.1 - Trattamento termico.

L'effetto inattivante dell'aumento della temperatura e' stato dimostrato sia negli ospedali che in alberghi. Impianti dell'acqua calda mantenuti a temperature superiori ai 50oC sono meno frequentemente colonizzati da Legionella.

L'aumento della temperatura dell'acqua calda e' uno dei metodi correntemente adoperato per il controllo della legionella nell'impianto di distribuzione dell'acqua. Una temperatura superiore a 60oC inattiva la legionella in modo proporzionale al tempo di esposizione.

(I limiti di temperatura di 48o-50oC previsti all' art. 5, comma 7 del decreto del Presidente della Repubblica n. 412 del 26 agosto 1993 "si applicano agli impianti termici ... destinati alla produzione centralizzata di acqua calda ... per una pluralita' di utenze di tipo abitativo...").

#### 8.1.1 - Shock termico.

Il metodo.

Elevare la temperatura dell'acqua a 70-80oC continuativamente per tre giorni e far scorrere l'acqua quotidianamente attraverso i rubinetti per un tempo di 30 minuti. Alcuni autori raccomandano di svuotare preventivamente i serbatoi dell'acqua calda, di pulirli ed effettuare una decontaminazione con cloro (100 mg/L per 12-14 ore).

E' fondamentale verificare che, durante la procedura, la temperatura dell'acqua nei punti distali raggiunga o ecceda i 60oC; se questa temperatura non viene raggiunta e mantenuta la procedura non fornisce garanzie.

Alla fine della procedura si devono effettuare dei prelievi d'acqua e dei sedimenti in punti distali dell'impianto e procedere ad un controllo batteriologico.

In caso di risultato sfavorevole, la procedura deve essere ripetuta fino al raggiungimento di una decontaminazione documentata.

Dopo la decontaminazione il controllo microbiologico deve essere ripetuto periodicamente secondo i criteri riportati nel paragrafo 9.1.4.

Vantaggi.

Non richiede particolari attrezzature e quindi può essere messo in atto immediatamente, vantaggio non trascurabile in presenza di un cluster epidemico.

Svantaggi.

Richiede tempo e personale, o l'installazione di sonde a distanza, per controllare la temperatura dell'acqua nei punti distali, nei serbatoi e il tempo di scorrimento dell'acqua. Inoltre è una modalità di disinfezione sistemica ma temporanea in quanto la ricolonizzazione dell'impianto idrico può verificarsi in un periodo di tempo variabile da alcune settimane ad alcuni mesi dopo lo shock termico se la temperatura dell'acqua circolante ritorna al di sotto dei 50°C.

8.1.2 - Mantenimento costante della temperatura tra 55-60°C all'interno della rete ed a monte della miscelazione con acqua fredda.

Questa tecnica pur garantendo una buona efficacia presenta l'inconveniente degli elevati consumi di energia e di conseguenza di costi elevati, a volte non compatibili con generali criteri di economia energetica. Inoltre, potrebbe presentare problemi di sicurezza per gli utenti della rete idrica.

In pratica:

nel caso di impianti a doppia regolazione, la prima (costituita da un termostato regolato a 55-60°C) serve a regolare la temperatura di accumulo, mentre la seconda (costituita da un miscelatore) serve a regolare la temperatura di distribuzione dell'acqua calda a 42-44°C.

In base alle temperature normalmente utilizzate, la legionella non può svilupparsi nei bollitori, ma soltanto nelle reti di distribuzione e di ricircolo.

Per ottenere la disinfezione termica di questi impianti si può:

1) by-passare il miscelatore con una valvola elettrica a due vie asservita ad un orologio programmatore;

2) fissare (con l'aiuto di un termostato) a 60°C la temperatura di produzione dell'acqua calda;

3) mandare in temperatura la valvola di by-pass per mezz'ora nel periodo notturno considerato a minor consumo d'acqua, facendo circolare acqua a 60°C.

Nel caso di impianti in cui l'acqua calda è prodotta e distribuita a 45-48°C, ad una temperatura leggermente superiore a quella di utilizzo, la regolazione finale è lasciata ai singoli rubinetti. Date le temperature relativamente basse, la legionella può colonizzare sia i bollitori, sia le reti di distribuzione e di ricircolo. La disinfezione termica, in questi impianti non è agevole per almeno tre motivi:

1) possono essere utilizzati solo sistemi di regolazione a punto fisso con almeno due livelli: quello di esercizio (45-48°C) e quello di disinfezione (60°C);

2) è difficile tenere sotto controllo i tempi della disinfezione, perché bisogna elevare la temperatura non solo dei bollitori, ma anche delle reti di distribuzione;

3) anche dopo il periodo di disinfezione, si è costretti a distribuire acqua troppo calda, non essendoci regolazione a valle dei bollitori.

Normalmente, considerando tali difficoltà, conviene cambiare sistema di regolazione e adottare quello con termostato e miscelatore.

8.2 - Clorazione.

Il cloro è un agente ossidante che è stato usato con successo per il controllo igienico-sanitario delle acque potabili. L'inattivazione e la soppressione di *L. pneumophila* richiedono una

concentrazione costante di cloro superiore a 3 mg/L.

Per la bonifica si utilizzano due approcci: l'iperclorazione shock e l'iperclorazione continua. Tali procedure implicano un conseguente aumento del cloro residuo nell'acqua e l'eventuale maggiore formazione di sottoprodotti (BPD). Per il monitoraggio e l'analisi sia batteriologica che del cloro residuo e dei depositi della rete idrica e' necessario personale qualificato.

La concentrazione del cloro varia in base alle caratteristiche organolettiche dell'acqua e alle caratteristiche strutturali dell'impianto. L'attivita' biocida del cloro, inoltre, e' sensibile al pH e decresce rapidamente sopra il valore 7. Occorre mantenere, quindi, il pH dell'acqua tra valori 6 e 7 per poter usare la concentrazione piu' bassa efficace di cloro.

#### 8.2.1 - L'iperclorazione shock.

Il metodo.

Deve essere effettuata su acqua a temperatura inferiore a 30°, con una singola immissione di cloro in acqua fino ad ottenere concentrazioni di cloro residuo libero di 20-50 mg/L in tutto l'impianto, ivi compresi i punti distali. Dopo un periodo di contatto di 2h con 20 mg/L di cloro oppure di 1h con 50 mg/L di cloro, l'acqua viene drenata e nuova acqua viene fatta scorrere nell'impianto fino a che il livello di cloro ritorna alla concentrazione di 0,5-1 mg/L. A tali concentrazioni di cloro l'acqua puo' essere considerata potabile, anche se il decreto del Presidente della Repubblica n. 236/1988 prevede un limite consigliato di 0,2 mg/L, vista la particolare situazione contingente.

#### 8.2.2 - L'iperclorazione continua.

Il metodo.

Si ottiene con l'aggiunta continua di cloro che puo' essere introdotto, di norma, sotto forma di ipoclorito di calcio o ipoclorito di sodio. I livelli residui di cloro in questo caso possono variare a seconda della qualita' dell'acqua, del flusso e della decontaminazione dai biofilm, comunque il disinfettante residuo deve essere compreso tra 1 e 3 mg/L. In presenza di aree di ristagno o problemi di ricircolazione nel sistema di distribuzione dell'acqua, il cloro in queste aree non inattivera' la legionella.

Vantaggi.

L'iperclorazione continua e' una modalita' di disinfezione generale che garantisce una concentrazione residua del disinfettante in tutto il sistema di distribuzione dell'acqua in modo da minimizzare la colonizzazione della legionella nei punti distali.

Svantaggi.

Lo svantaggio dell'iperclorazione continua e' che il cloro e' corrosivo e puo' provocare danni alle tubature. Inoltre, la quantita' di cloro residuo prevista e' difficilmente compatibile con gli standard attuali dell'acqua potabile sia come disinfettante residuo che come presenza di sottoprodotti (BPD).

#### 8.3 - Biossido di cloro.

L'impiego del biossido di cloro e' in corso di sperimentazione in alcuni Paesi, ma ancora non vi sono elementi sufficientemente convalidati per un suo impiego sicuro ed efficace. Tale metodica, infatti, richiede la presenza di un generatore di cloro le cui condizioni di sicurezza vanno garantite.

Le concentrazioni, proposte da alcuni Autori, sono variabili da 0,1 a 1,0 mg/L a seconda dei settori dell'impianto idrico in cui viene impiegato (serbatoi, tubazioni, ecc.). Inoltre ha efficacia diversa sui vari tipi di materiali (efficacia maggiore su gomma rispetto alla plastica; mentre non sembra impiegabile con tubazioni in rame).

#### 8.4 - Lampade a raggi ultravioletti.

L'irradiazione con luce ultravioletta e' un metodo alternativo interessante per la disinfezione dell'acqua potabile. La luce ultravioletta (254 nm) inattiva i batteri producendo dei dimeri di

termina nel DNA che ne ostacolano la replicazione. L'applicazione della luce ultravioletta e' una modalita' di disinfezione che risulta essere maggiormente efficace in vicinanza del punto di impiego. Tale tecnica non e' adeguata come unica modalita' per un intero edificio poiche' non possiede effetto residuo mentre la legionella persiste nei biofilm, nei punti morti e nelle sezioni stagnanti dell'impianto. Il metodo.

L'apparecchio dovrebbe essere vicino al punto di utilizzo. L'acqua scorre in una parte della camera idraulica e l'esposizione alla luce ultravioletta generata da lampade di mercurio a bassa pressione la disinfetta. I metodi dello shock termico o della clorazione possono essere utilizzati prima dell'applicazione della luce ultravioletta per controllare le legionelle presenti nell'impianto.

Vantaggi.

I vantaggi della luce ultravioletta sono la facilita' d'installazione dell'apparecchio e l'assenza di effetti avversi sull'acqua o sulle tubature. A differenza di quanto accade con le sostanze chimiche, il sapore dell'acqua non viene influenzato e non ci sono sottoprodotti.

Il trattamento puo' essere piu' efficace se il controllo della legionella e' localizzato in aree piccole come ad esempio un reparto di terapia intensiva.

Svantaggi.

Lo svantaggio principale consiste nel fatto che il flusso dell'acqua sottoposta all'azione dei raggi deve avere uno spessore di pochi centimetri (in genere fino a 3 cm) e deve essere scarsamente torbida per non limitarne l'efficienza. Inoltre, la mancanza di protezione residua nei punti distali, ne limita le potenzialita'.

8.5 - Ionizzazione rame/argento.

Metalli come il rame e l'argento sono noti agenti battericidi e l'effetto e' dovuto alla loro azione sulla parete cellulare del microrganismo, che comporta una distorsione della permeabilita' cellulare che, unita alla denaturazione proteica, porta le cellule alla lisi e alla morte.

Il metodo.

Gli ioni di rame ed argento sono generati elettroliticamente e la loro concentrazione nel mezzo acquoso dipende dalla potenza applicata agli elettrodi. La dose d'attacco proposta da alcuni autori per la prevenzione di legionellosi nosocomiale e' di 0,02-0,08 mg/L di argento e 0,2-0,8 mg/L di rame.

Vantaggi.

Il metodo e' di facile applicazione e non e' influenzato dalla temperatura dell'acqua. Inoltre, a causa dell'accumulo del rame nel biofilm l'effetto battericida persiste per alcune settimane dopo la disattivazione del sistema e questo riduce la possibilita' di una ricolonizzazione.

Svantaggi.

Poiche' il sistema e' soggetto a delle fluttuazioni di concentrazione e' necessario controllare sistematicamente la concentrazione dei due metalli oltreche' il pH dell'acqua (6-8). Tale tecnica non e' adatta per reti idriche in zinco poiche' questo metallo produce l'inattivazione degli ioni argento. Inoltre, in caso di trattamento continuo bisogna verificare il non superamento della concentrazione massima ammissibile (CMA) prevista dalla legislazione vigente per l'acqua potabile.

8.6 - Perossido di idrogeno e argento.

Il trattamento viene effettuato tramite una soluzione stabile e concentrata di perossido di idrogeno (acqua ossigenata) e argento, sfruttando l'azione battericida di ciascuna delle due componenti e la sinergia che tra di loro si sviluppa. La tecnica e' relativamente recente come applicazione e necessita di ulteriori conferme sperimentali.

## tabella 5

### 9.0 - STRATEGIE DI INTERVENTO

#### 9.1 - Ospedali, Case di cura.

La legionellosi deve essere sempre considerata nella diagnosi differenziale delle polmoniti nosocomiali.

##### 9.1.1 - Definizione di infezione nosocomiale.

Si definisce caso accertato di legionellosi nosocomiale un caso confermato mediante indagini di laboratorio verificatosi in un paziente che e' stato ospedalizzato continuativamente per almeno 10 giorni prima dell'inizio dei sintomi. Un'infezione che si manifesta in un paziente ricoverato per un periodo variabile da 2 a 9 giorni e' considerato un caso di malattia di possibile origine nosocomiale.

Due o piu' casi che si verificano in un ospedale nell'arco di 6 mesi, vengono invece definiti come un'epidemia ospedaliera.

Negli ospedali, anche in assenza di casi evidenti, i medici devono prestare attenzione al problema. Un aumento del numero di polmoniti nosocomiali deve far pensare a un cluster di casi di legionellosi e deve indurre i medici a richiedere gli esami specifici in questi malati.

9.1.2 - L'indagine di una legionellosi nosocomiale deve seguire le seguenti tappe:

1. Conferma della diagnosi. Se possibile isolamento colturale e identificazione precisa del germe in causa.

2. Notifica alle autorità sanitarie.

3. Ricerca dell'esposizione: locali frequentati e trattamenti a rischio.

4. Ricerca di altri casi. Adozione di un protocollo per la ricerca della legionella in tutti i nuovi casi di polmonite nosocomiale. Se la situazione e' di particolare gravità, può essere necessario condurre un'indagine retrospettiva (titoli anticorpali su sieri conservati, ricerca dell'antigene urinario in malati recenti).

5. Descrizione della distribuzione nel tempo e nello spazio dei casi confermati, dei casi possibili e eventualmente dei casi dubbi. Rappresentazione grafica della curva epidemica e piano della situazione. Descrizione dei trattamenti a rischio e del tipo di acqua utilizzata per i differenti trattamenti.

6. Ricerca di esposizioni comuni.

7. Ipotesi sulla possibile origine dell'infezione.

8. Indagini ambientali mirate in base alle ipotesi emerse dallo studio descrittivo.

9. 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.

10. Eventualmente, se l'origine dell'epidemia resta difficile da identificare, effettuare un'indagine di tipo caso-controllo.

Per riassumere, al verificarsi di uno o più casi di infezione nosocomiale adottare i seguenti provvedimenti:

1. L'informazione dell'evento deve essere diffusa rapidamente al personale sanitario.

2. La sorveglianza attiva dei possibili ulteriori casi deve essere avviata.

3. La sorveglianza ambientale con ricerca della legionella nelle possibili fonti di contagio dovrà essere attivata.

9.1.3 - La valutazione del rischio di contrarre la malattia suggerisce di applicare le misure seguenti:

Presenza di una concentrazione di legionelle fino a 102 UFC/L (assenza di casi): non e' necessario alcun intervento.

Presenza di una concentrazione di legionelle compresa tra 103-104 UFC/L: contaminazione, si potrebbero verificare casi sporadici:

in assenza di casi e' raccomandata una 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. Ripetere periodicamente i controlli batteriologici;

in presenza di un caso effettuare la bonifica ambientale ed adottare misure specifiche di prevenzione e controllo.

Presenza di una concentrazione di legionelle > 104 UFC/L: contaminazione importante. Mettere in atto immediatamente misure di decontaminazione: shock termico o iperclorazione. Successiva verifica dei risultati.

Nel caso si verificassero le condizioni che richiedono un intervento di bonifica, utilizzare uno o più metodi precedentemente illustrati.

La valutazione delle cariche batteriche deve essere effettuata utilizzando modalità corrette di campionamento (vedi All. 2) ed un piano di campionamento definito.

#### 9.1.4 - Misure a breve termine.

Poiché i metodi massivi di disinfezione non sono sufficienti per eliminare definitivamente la presenza di legionella in una rete dell'acqua calda e la disinfezione puntuale di una rete senza misure strutturali ha solo un'azione temporanea, è necessario mettere in atto le seguenti misure a breve termine:

sostituzione dei giunti, filtri dei rubinetti e cingole delle docce, tubi flessibili delle docce usurati e di ogni altro elemento di discontinuità;

decalcificazione degli elementi meno usurati in una soluzione acida (per es. acido sulfamico, aceto bianco ecc.) e disinfezione in una soluzione contenente almeno 50 mg di cloro libero per litro d'acqua fredda per almeno 30 minuti.

Dopo la bonifica, effettuare ulteriori controlli ambientali con la seguente cadenza:

- immediatamente dopo la bonifica;
- se il risultato è negativo, dopo 15-30 giorni;
- se negativo, dopo tre mesi;
- se negativo, periodicamente ogni sei mesi.

#### 9.1.5 - Misure a lungo termine.

Le misure sopracitate hanno un effetto limitato nel tempo, e quindi necessario mettere in pratica le seguenti misure a lungo termine:

almeno una volta l'anno svuotare, pulire e disinfettare serbatoi, scaldabagni e tubature. I prodotti chimici utilizzati devono essere puri, gli operatori devono essere protetti e la disinfezione praticata dopo la pulizia e il risciacquo. Un risciacquo prolungato seguito eventualmente da una disinfezione è necessario dopo l'installazione di nuove tubature e dopo lavori di manutenzione dell'impianto;

il controllo della formazione di depositi di calcare può essere realizzato, se necessario, sui circuiti dell'acqua calda con l'aiuto degli usuali sistemi in commercio (resine a scambio ionico, ecc.). In questo caso è necessario un monitoraggio giornaliero da parte di personale appositamente addestrato;

la decalcificazione periferica delle docce deve essere effettuata regolarmente, al minimo una volta all'anno;

in occasione di lavori sulla rete idrica:

approfittare per eliminare bracci morti e tubi ostruiti. Aggiornare la pianta della rete;

effettuare un risciacquo prolungato che può essere seguito da una disinfezione e da un altro risciacquo.

Per le attrezzature che generano aerosol (umidificatori, attrezzature per l'assistenza respiratoria, sonde nasogastriche, drenaggi, ecc.), è opportuno utilizzare sempre acqua sterile sostituita giornalmente e mai rabboccata. I componenti delle attrezzature per l'assistenza respiratoria devono essere monouso sterili o, comunque, decontaminati in modo adeguato dopo l'uso.

Infine se i casi sono associati ad impianti di condizionamento dell'aria, occorre bloccarli, procedere alla loro pulizia e disinfezione, alla loro modifica (se necessaria) ed alla loro regolare manutenzione con particolare riferimento alla sostituzione dei filtri; vanno inoltre modificati i sistemi di umidificazione dell'ambiente.

#### 9.2 - Comunita'.

Anche per i casi che si verificano in comunita' deve essere effettuata un'indagine epidemiologica ed ambientale per la valutazione dell'esposizione (come al punto 9.1.3.) e per la diagnosi dei casi.

Strutture recettive (alberghi, campeggi, navi, impianti sportivi e ludici, fiere, esposizioni, ecc.):

presenza di una concentrazione di legionelle compresa tra 103-104 UFC/L: in assenza di casi effettuare la sorveglianza epidemiologica:

in presenza di uno o piu' casi associati al soggiorno nella struttura alberghiera, effettuare la bonifica ambientale;

presenza di una concentrazione di legionelle > 104 UFC/L: contaminazione importante. Mettere in atto immediatamente misure di decontaminazione: shock termico o iperclorazione, sia in presenza che in assenza di casi. Successiva verifica dei risultati.

E' molto importante la successiva verifica dei risultati e la messa in atto delle misure a breve e a lungo termine descritte in precedenza.

In aggiunta negli edifici a funzionamento stagionale, prima della riapertura procedere a una pulizia completa dei serbatoi e della rubinetteria, e far defluire a lungo l'acqua da tutti i rubinetti.

Negli edifici in cui gli appartamenti o le camere restano vuoti per periodi prolungati conviene far defluire l'acqua ai punti di utilizzazione, in particolare prima di mettere a disposizione la camera ad un nuovo occupante per ridurre l'esposizione alla legionella.

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.

#### 10.0 - MISURE PREVENTIVE PER LE PISCINE

Per quanto riguarda le piscine alimentate con acqua dolce, la normativa vigente prevede una concentrazione di cloro attivo libero nell'acqua della vasca pari a 1 mg/l (0,7-1,2 mg/l). Sebbene tali valori del cloro rendano improbabile un'eventuale contaminazione da legionella, tuttavia, si raccomanda in occasione dello svuotamento periodico della vasca (da effettuarsi almeno una volta all'anno) la pulizia disinfezione shock della vasca, delle tubature e la sostituzione dei filtri della vasca, la revisione accurata dei sistemi di circolazione dell'acqua, con eliminazione di ogni deposito ed inoltre la periodica manutenzione con smontaggio e accurata pulizia di rubinetti e docce.

Per quanto riguarda gli stabilimenti termali, un trattamento di disinfezione delle acque non appare attuabile in quanto l'acqua minerale naturale utilizzata per le cure termali non puo' essere trattata, mentre si puo' procedere ad un'adeguata progettazione degli impianti, evitando l'uso di materiale e componenti che forniscano un pabulum per la legionella (ad esempio alcune gomme utilizzate per le guarnizioni) o mediante una strutturazione dell'impianto che eviti rallentamenti del flusso idrico o ristagni.

Ai fini della sorveglianza epidemiologica si ritiene opportuno che gli operatori sanitari inseriscano tra le informazioni anamnestiche di ogni paziente affetto da polmonite anche l'eventuale frequentazione di piscine nelle due settimane precedenti l'insorgenza dei sintomi della malattia. In caso di anamnesi positiva e' opportuno sottoporre il paziente ad adeguati esami microbiologici e di

tipizzazione molecolare.

#### 11.0 - MISURE DI SICUREZZA PER LE PROCEDURE DI DECONTAMINAZIONE

Sebbene esistano pochissimi dati in letteratura, si ritiene che gli addetti alla manutenzione o alla pulizia di sistemi di smaltimento del calore di tipo umido (Wet Type Heat Rejection, WTHR) o di altri dispositivi produttori di aerosol siano da ritenersi lavoratori ad alto rischio di esposizione per la legionella. Per questi soggetti la piu' valida misura di prevenzione e' costituita dall'uso di una maschera respiratoria dotata di filtro HEPA o "tipo H" ad alta efficienza. I filtri in grado di trattenere aerosol, nebbie, particolati, particelle di amianto, ecc., dovrebbero essere in grado di assicurare una adeguata protezione nei confronti della legionella.

L'uso della maschera e' particolarmente raccomandato nelle operazioni di pulizia basate sull'impiego di vapore, acqua o aria ad alta pressione o su altri mezzi che possono generare aerosol.

Per gli addetti alla decontaminazione, inoltre, si raccomandano misure di protezione aggiuntive: guanti di gomma, occhiali e tute protettive.

#### BIBLIOGRAFIA SELEZIONATA

1. World Health Organization. Epidemiology, prevention and control of legionellosis: Memorandum from a WHO meeting. Bulletin of the World Health Organization, 1990, 58: 155-164.
2. Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for Prevention of Nosocomial Pneumonia. MMWR 1997; 46(RR-1):1-79.
3. Castellani Pastoris M. Legionellosi: una malattia di rilievo ancora sottovalutata. L'Igiene Moderna, 1999:111, 105-115.
4. Ministe're du Travail et des Affaires Sociales. Direction ge'ne'rale de la Sante'. Guide d'investigation d'un ou plusieurs cas de le'gionellose. Bulletin e'pide'miologique hebdomadaire 1997, 20-22:83-105.
5. Office fe'de'ral de la sante' publique. Le'gionelles et le'gionellose. Particularite's biologiques, e'pide'miologie, aspects cliniques, enquêtes environnementales, pre'vention et mesures de lutte. Berne, OFSP, 1999.
6. Lin Yu, Stout JE, Yu VL. Disinfection of water distribution systems for Legionella. Semin Resp Infect, 1998; 13:147-159.
7. Yu VL, Liu Z, Stout JE, Goetz A. Legionella disinfection of water distribution systems: principles, problems, and practice. Infect Control Hosp Epidemiol 1993; 14:567-570.
8. Korvick J, Yu VL, Fang GD. The role of Legionella sp. in nosocomial pneumonia. Semin Respiratory Infections 1987; 2:34-47.
9. United Kingdom Department of Health: The Control of Legionella in Health Care Premises - A Code of Practice. London, UK, Her Majesty's Stationary Office, 1991.
10. United Kingdom Department of Health: The prevention and control of legionellosis (including Legionnaires' Disease). Approved Code of Practice. London, UK, Her Majesty's Stationary Office. Health and Safety Executive 1991/1993.
11. Drasar V, Pospichal Z, Luck PC. Outbreak of L. pneumophila sg 3 among kidney transplants in Prague (Abstract). European Working Group on Legionella Infections (EWGLI). 14th Meeting 1999. Abstract book.
12. Castellani Pastoris M., Benedetti P. Legionella e legionellosi. Istituto Superiore di Sanita' e Assessorato alla Sanita' Regione Campania 1993.
13. Ezzeddine H, Van Hossel C, Delmee M, Wauters C. Legionella spp. in a hospital hot water system: effect of control measures. J Hosp Inf 1989; 13: 121-131.
14. Yu VL, Beam TR, Lumish RM, Vickers RM, Fleming J, McDermott C, Romano J. Routine culturing for Legionella in the hospital environment may be a good idea: a 3 hospital prospective study. Amer J Med Sci 1987; 294: 97-99.

15. Vickers RM, Yu VL, Hanna S, Muraca P, Diven W, Carmen N, Taylor F. Determinants of *L. pneumophila* contamination of water distribution systems: 15 hospital prospective study. *Infect Control* 1987; 8: 357-363.
16. Goetz A, Yu VL. Screening for nosocomial legionellosis by culture of the water supply and targeting high risk patients for specialized laboratory testing. *Amer J Infect Control* 1991; 19: 63-66.
17. Liu Z, Stout JE, Tedesco L, Boldin M, Hwang C, Yu VL. Efficacy of ultraviolet light on the disinfection of *Legionella* in a hospital water distribution system. *Water Research* 1995; 29: 2275-2228.
18. Liu Z, Stout JE, Boldin M, Rugh J, Diven WF, Yu VL. Intermittent use of copper-silver ionization for *Legionella* control in water distribution systems: a potential option in buildings housing low risk individuals. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 138-140.
19. Rota MC, Castellani Pastoris M, Salmaso S. La legionellosi in Italia nel 1997. *Notiziario ISS*, 1998, vol 11, N. 11.
20. Rota MC, Castellani Pastoris M, Salmaso S. La legionellosi in Italia nel 1998. *Notiziario ISS*, 1999, vol 12, N. 8.
21. Vergis EN, Yu VL. *Legionella* species in Antimicrobial Therapy and Vaccines. Editors VL Yu, TC Merigang, sl Barriere. 1999, pg. 257-272.
22. American Society for Testing and Materials (ASTM). Standard guide for inspecting water systems for *Legionellae* and investigating possible outbreaks of legionellosis (*Legionnaires' Disease* or *Pontiac Fever*). AMST, West Conshohocken, PA, USA, 1999.
23. Klein NC, Cunha BA. Treatment of *Legionnaires' Disease*. *Seminars in Respiratory Infections*, 1988, Vol. 13, N.2 (June), 140-146.
24. World Health Organization. *Weekly Epidemiological Record. Legionnaires' Disease, Europe*, 1998. 1999, 74, N. 33, 273-277.
25. Breiman RF, Butler JC. *Legionnaires' Disease: clinical, epidemiological, and public health perspectives*. *Seminar in Respiratory Infections*, 1998, Vol 13, N. 2 (June), 84-89.
26. Fallon RJ, Rowbotham TJ. Microbiological investigation into an outbreak of Pontiac fever due to *Legionella micdadei* associated with use of a whirlpool. *J. Clin. Pathol.*, 1990; 43: 479-483.
27. Spitalny KC, Vogt RL, Orciari LA, Witherell LE, Etkind P, Novick LF. Pontiac fever associated with a whirlpool spa. *Am. J. Epidemiol.* 1984; 120: 809-817.
28. VDI 6022 Hygienic Standards or Ventilation and Air-conditioning Systems, 1998.
29. De Santoli L, Fracastoro GV. *Qualita' dell'Aria negli Ambienti Interni - Soluzioni e Strategie*, AICARR, Milano, 1998.
30. ASTM, *Inspecting Water System for Legionellae*, 1996.
31. Circolare DGS n. 97/311 du 24-4-97 relative a la surveillance et la prevention de la legionellose.
32. Legionellosis Position Paper approved by ASHRAE BoD, June 25, 1998.

Allegato 1

#### RICERCA DI LEGIONELLA IN CAMPIONI ORGANICI

##### 1. - Campionamento.

*Legionella* puo' essere ricercata nel materiale proveniente dall'apparato respiratorio (espettorato e/o sputo, broncoaspirato, broncolavaggio, parenchima polmonare) e nell'essudato pleurico e pericardico. Sono talvolta positive colture effettuate con emocoltura risultate negative per altri microrganismi, oppure positive in caso di doppia infezione.

Tutti i campioni devono essere raccolti in contenitori sterili con tappo a vite idonei per la centrifugazione.

Quando necessario, al fine di evitare l'essiccamento dei

materiali, aggiungere al campione 1-2 ml di acqua distillata sterile.

Non utilizzare soluzioni saline (soluzione fisiologica) 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.

2. - Trasporto e conservazione.

Non è necessario l'impiego di terreni di trasporto. I campioni devono essere trasportati in laboratorio nel più breve tempo possibile. Se si prevede un tempo superiore a 30 minuti, mantenere il campione refrigerato. Se possibile evitare il congelamento.

3. - Protocollo analitico.

L'escreato ed il tessuto polmonare contengono sostanze inibenti lo sviluppo di Legionella. È pertanto consigliabile diluire i campioni in una piccola quantità di acqua distillata sterile oppure in brodo non contenente NaCl. Se l'espettorato è molto denso, deve essere trattato con un fluidificante. I broncolavaggi e le emocolture possono essere concentrate per centrifugazione (3000 r.p.m. per 20 minuti). I campioni prevedibilmente contaminati dovranno essere in parte trattati a 50°C per 30 minuti. Oppure, in alternativa, potranno essere trattati diluendoli 1:10 con una soluzione tamponata di HCl-KCl a pH 2,22), e mantenendoli a temperatura ambiente per 5 minuti.

Piastrare 0,1 ml dei campioni trattati e non trattati su una piastra di BCYE agar e una di BCYE agar selettivo (le denominazioni del terreno selettivo sono diverse secondo le sostanze ad azione antibatterica e antifungina in esso contenute).

Incubare a 36-37 °C in aerobiosi, in ambiente umido, con 2,5% di CO<sub>2</sub>, oppure in microaerofilia.

Esaminare giornalmente ed eliminare una piastra come negativa solo dopo almeno 10 giorni di incubazione (Allegato 3).

2) Soluzione tamponata a PH 2,2: 3,9 ml di HCl 0,2 M + 25ml 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 minuti.

Allegato 2

#### RICERCA DI LEGIONELLA IN CAMPIONI AMBIENTALI 79

1. - Campionamento.

Eseguire le operazioni osservando le precauzioni necessarie alla tutela della salute dell'operatore (mascherine, guanti, occhiali). Legionella sarà ricercata nell'ambiente idrico artificiale (impianti idrici, impianti di climatizzazione con refrigerazione ad acqua o ad aria, fontane decorative, idromassaggi, apparecchiature mediche per la respirazione assistita, stabilimenti termali) limitando i prelievi ai punti che maggiormente possono essere critici, sia in base alla struttura dell'impianto sia in funzione dei dati epidemiologici.

I campioni sono rappresentati da:

acqua del circuito dell'acqua calda e di quello dell'acqua fredda qualora la temperatura sia superiore a 20°C;

depositi (cosiddetti "fanghi") da serbatoi e altri punti di raccolta dell'acqua;

incrostazioni da tubature e serbatoi;

tamponi utilizzati per raccogliere biofilm e altro materiale adesivo alle pareti di tubature, sbocco di rubinetti, filtri rompigitto, interno del bulbo delle docce;

acqua di condensa e acqua di sifoni ed altre parti degli impianti per l'aria condizionata e di umidificazione;

acqua proveniente da sgocciolamento dalle torri di raffreddamento;

filtri da impianti di climatizzazione.

2. - Modalità di prelievo.

2.1 - Acqua.

Il volume consigliabile e' di almeno 1 litro, quando possibile, L'acqua sara' raccolta in recipienti sterili. Nel caso essa contenga cloro sara' opportuno aggiungere sodio tiosolfato ad una concentrazione finale di 0,01% (da una soluzione al 10% mettere 0,1 ml per 100 ml di acqua);

per la ricerca di Legionella in condizioni di utilizzo comune, prelevare, preferibilmente dal circuito dell'acqua calda, senza flambare al punto di sbocco e senza far scorrere precedentemente l'acqua;

per una ricerca quantitativa di Legionella nell'acqua all'interno dell'impianto, prelevare dopo aver fatto scorrere l'acqua per 5-10 minuti, flambando allo sbocco.

#### 2.2 - Depositi.

Prelevare dallo scarico, oppure dal fondo della raccolta di acqua dopo aver eliminato l'acqua dall'alto. Raccogliere in recipienti sterili.

#### 2.3 - Incrostazioni.

Prelevare da tubature e serbatoi, staccando meccanicamente il materiale depositatosi all'interno. Raccogliere in recipienti sterili.

#### 2.4 - Tamponi.

Con un tampone sterile raccogliere il materiale depositato sulle superfici interne. Conservare il tampone in recipiente (provetta) con tappo a vite, contenente una piccola (2 ml) quantita' dell'acqua dell'impianto.

#### 2.5 - Filtri.

Il controllo deve essere eseguito su filtri utilizzati da diverso tempo, e non su quelli lavati o sostituiti di recente. Prelevare il filtro e conservarlo in un sacchetto di materiale plastico.

### 3. - Trasporto e conservazione.

I campioni devono essere conservati a temperatura ambiente, al riparo dalla luce. Vanno consegnati in tempo utile affinche' l'analisi venga iniziata non oltre 24 ore dal prelievo. In caso di tempi piu' lunghi, conservare i campioni a 4 oC e, comunque, per un periodo non superiore ai 7 giorni.

### 4. - Protocollo analitico.

#### 4.1 - Acqua.

Concentrare mediante filtrazione per membrana con porosita' 0,2 &micro;m. Talvolta puo' essere necessario utilizzare piu' membrane in successione. Prelevare la/le membrane con pinzette sterili e deporle in un contenitore sterile con tappo a vite contenente 10 ml della stessa acqua. Risospendere quanto depositato sulla membrana aiutandosi con una bacchetta a punta arrotondata oppure agitando energicamente su vortex.

Trattare parte della sospensione a 50oC per 30 minuti. Oppure, in alternativa, trattare con soluzione tamponata HCl-KCl a pH 2,2 (vedere la composizione nella nota dell'Allegato 1). In tale caso, centrifugare 10 ml della sospensione concentrata a 3000 r.p.m. per 20 minuti, rimuovere il sopranatante lasciandone 1 ml, aggiungere 9 ml della soluzione tamponata acida, mescolare bene e lasciare a temperatura ambiente per 5 minuti.

Piastrare 0,1 ml dei campioni trattati e non trattati su una/due piastre di terreno selettivo per Legionella.

Incubare a 36-37oC in aerobiosi, in ambiente umido, con 2,5% di CO<sub>2</sub>, oppure in microaerofilia.

Conservare il campione concentrato a 4oC.

Esaminare giornalmente le piastre. Qualora il campione fosse molto contaminato (presenza di numerose colonie dopo 24-48 ore dalla semina), sara' necessario eseguire diluizioni in base 10 (10<sup>-1</sup> e 10<sup>-2</sup>) con acqua distillata sterile del campione concentrato, eseguire un trattamento come indicato in precedenza, e piastrare 0,1 ml su terreno selettivo.

Eliminare una piastra come negativa solo dopo almeno 10 giorni di

incubazione.

Nel caso di presenza di colonie di Legionella (Allegato 3) si potrà effettuare una valutazione quantitativa (unita' formanti colonia/Litro, UFC/L) in base al numero di colonie per piastra ed alla concentrazione effettuata sul campione originale, tenendo conto anche delle eventuali diluizioni effettuate successivamente.

4.2 - Depositi.

Effettuare diluizioni in base 10 (10-1 e 10-2) con acqua distillata sterile e agitare bene. Trattare le sospensioni come descritto al punto 4.1. Piastrare su terreno selettivo solo le sospensioni trattate.

4.3 - Incrostazioni.

Frantumare e tritare le incrostazioni in mortaio o mixer sterili. Risospendere in acqua distillata sterile. Procedere come al punto 4.2. Piastrare su terreno selettivo il campione indiluito e diluito, senza e con trattamento.

4.4 - Tamponi.

Agitare il tampone nella provetta per rimuovere il materiale raccolto. Trattare parte del campione come descritto al punto 4.1. Piastrare su terreno selettivo sia le sospensioni non trattate che quelle trattate.

4.5 - Filtri.

Lavare il filtro o parte di esso in acqua distillata sterile e procedere come al punto 4.1.

Allegato 3

#### ISOLAMENTO DI LEGIONELLA SP

1. - Coltura.

Le colonie di Legionella, si presentano piccole, di colore bianco-grigio, leggermente convesse, con bordi "a vetro smerigliato" se osservate con luce laterale. Compaiono dopo un periodo da 4 a 10 giorni di incubazione. Su terreno contenente coloranti (MWY) alcune specie possono assumere una colorazione caratteristica secondo la specie stessa.

2. - Prova differenziale preliminare.

Passare ogni colonia sospetta sia su BCYE agar (completo di supplemento di crescita) sia su CYE agar base (privo di supplemento di crescita) o su comune terreno di coltura (agar sangue, Mac Conkey). Incubare a 37°C per 48 ore. Le colonie di Legionella presenteranno crescita sul terreno completo ed assenza di crescita sul terreno base o sul terreno comune, per l'incapacità di Legionella di moltiplicarsi in assenza di cisteina e parzialmente anche di ferro. Occorre tenere presente che su terreno di agar sangue vi può essere una piccola crescita iniziale dovuta a tracce di sostanze che possono supplire alle necessità del microrganismo.

3. - Identificazione.

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.

Se osservate sotto raggi UV a lunghezza d'onda di 366 nm, alcune specie mostrano una autofluorescenza bianco-blu oppure rossastra.

La tipizzazione si farà su base antigenica con prove sierologiche quali immunofluorescenza diretta o indiretta, agglutinazione al lattice, agglutinazione diretta (Reagenti disponibili in commercio).

Una subtipizzazione molecolare, sia antigenica che genomica, sarà utile per un confronto di stipti di origine clinica ed ambientale.

Allegato 4

REVISIONE CIRCOLARE N. 400.2/9/5708 DEL 29 DICEMBRE 1993

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 piu' mirati, che consentano di conoscere piu' precisamente l'andamento dei casi di legionellosi nel nostro Paese.

Sostanzialmente la parte anagrafica e relativa alle manifestazioni cliniche e' rimasta invariata. Di seguito vengono riportate le modifiche apportate alla scheda:

e' stata aggiunta una voce relativa alla terapia con immunosoppressori e corticosteroidi (tale voce e' stata ritenuta un'importante informazione, in quanto pazienti sottoposti a tali trattamenti sono a maggior rischio di infezione);

e' stata tolta la voce relativa al trattamento con antibiotici prima del ricovero (tale voce non era quasi mai compilata e, dai dati registrati, i pazienti compresi nella sorveglianza risultavano, a causa dei sintomi, precocemente ospedalizzati e trattati in seguito al ricovero);

e' stata ampliata la voce relativa al ricovero ospedaliero con la richiesta di specificare oltre l'ospedale, anche il reparto presso cui e' avvenuto il ricovero (tale voce e' stata ampliata per consentire di individuare in una stessa struttura ospedaliera reparti a maggior rischio e, di conseguenza, individuare tempestivamente focolai epidemici, permettendo interventi preventivi mirati);

e' stata ampliata la voce relativa al soggiorno in strutture diverse dall'abitazione abitazione, aggiungendo la specifica del nome e localita' della struttura, il numero della stanza nella quale il paziente ha soggiornato, nonche' il nome dell'eventuale operatore turistico e se il viaggio era individuale o in gruppo (tale voce e' stata ampliata per identificare strutture recettive a maggior rischio, sempre al fine di attuare interventi preventivi; l'informazione sul viaggio individuale o in gruppo e' finalizzata alla ricerca dei co-esposti);

e' stata aggiunta la voce "antigene urinario" ai metodi diagnostici (tale voce e' stata aggiunta perche' riconosciuta, a livello internazionale, quale mezzo diagnostico utile all'individuazione dei casi di legionellosi);

e' stata aggiunta la voce "Indagine ambientale" con le informazioni relative all'eventuale isolamento del ceppo (tale voce e' stata aggiunta per avere informazioni in merito in quanto e' fondamentale poter confrontare il ceppo isolato a livello ambientale con quello isolato dal paziente).

Dalla valutazione dei dati epidemiologici relativi alla sorveglianza e' stato osservato che la parte della scheda relativa ai valori emato-chimici, inizialmente utile per una migliore conoscenza dell'andamento di tali valori durante il decorso della malattia, e' attualmente superata.

La scheda modificata, di seguito riportata, sostituisce la precedente allegata alla Circolare n. 400.2/9/5708 del 29 dicembre 1993, e dovra' essere utilizzata per la segnalazione dei casi di Legionellosi.