



Dottorato in Medicina Molecolare e Clinica
Dipartimento per la Promozione della Salute Materno-Infantile, di Medicina Interna e
Specialistica d'Eccellenza "G. D'Alessandro".
Università degli Studi di Palermo
Settore Scientifico Disciplinare MEDS 05/A

Cambiamenti climatici e Malattie Infettive
La valutazione della diffusione di Legionella spp. e potenziali
miglioramenti nei protocolli di sanificazione

IL DOTTORE
GINEVRA MALTA

IL COORDINATORE
CH.MO PROF. ANTONINO TUTTOLOMONDO

IL TUTOR
CH.MO PROF. DOMENICO DI RAIMONDO

CO TUTOR
CH.MA PROF.SSA ANTONINA ARGO
CH.MO PROF. EMANUELE CANNIZZARO
CH.MA PROF.SSA PAOLA DI CARLO

Indice

Prefazione.....	4
1. Introduzione e Note Dottrinali	7
1.1 Malattie trasmesse dall'acqua (Waterborne Diseases, WBD).....	9
1.1.1 Malattie trasmesse dall'acqua.....	13
1.1.2 Le acque come sorgenti di microrganismi	15
1.1.3 Fattori di rischio per le Waterborne Diseases.....	18
1.2. Patogeni causa di Waterborne Diseases	21
1.3 Legionella spp.	23
1.3.1 Caratteristiche microbiologiche.....	25
1.3.2 Habitat.....	28
1.3.3 Fattori che influenzano lo sviluppo di Legionella	28
1.3.4 Legionellosi	32
1.3.5 Fattori di rischio	39
1.3.6 Aspetti clinici.....	41
1.3.7 Sindrome extra-polmonare.....	50
1.3.8 Epidemiologia	51
1.3.9 Diagnostica	53
1.3.10 Notifica dei casi e Sorveglianza Sanitaria	56
1.3.11 Metodi di prevenzione e bonifica	62
2. Scopo della tesi.....	67
3. Materiali e Metodi.....	69
3.1. Contesto dello studio e selezione dei siti di campionamento	69
3.2 Progettazione sperimentale e frequenza di campionamento	69
3.3 Metodologie di campionamento e conservazione	69
3.4 Tecniche di analisi microbiologica	70
3.5 Isolamento culturale su terreno selettivo.....	70

3.6 Analisi molecolare con PCR e RT-qPCR.....	70
3.7 Analisi statistica	71
3.8 Considerazioni etiche e normative.....	71
4. Risultati e Discussione.....	72
5. Conclusioni.....	82
Bibliografia	85

Prefazione

Il legame tra cambiamenti climatici e malattie infettive è un tema di crescente interesse e preoccupazione nel campo della salute pubblica e delle scienze ambientali ¹. L'interazione tra il clima e la diffusione delle malattie infettive è complessa e multifattoriale, coinvolgendo variabili come la temperatura, le precipitazioni, l'umidità e la distribuzione geografica di vettori e ospiti ².

Il riscaldamento globale, uno dei principali aspetti del cambiamento climatico, sta alterando la distribuzione delle temperature medie globali. Questo ha implicazioni dirette sulla biologia dei vettori di malattie come le zanzare, che sono responsabili della trasmissione di patogeni come la malaria, il dengue e il virus Zika. Gli studi indicano che le temperature più alte possono accelerare il ciclo di vita delle zanzare, aumentare la frequenza delle punture e ridurre il periodo di incubazione del virus all'interno delle zanzare, favorendo una trasmissione più rapida ed efficiente dei patogeni. Secondo diversi autori, il cambiamento climatico potrebbe espandere l'area geografica adatta alla trasmissione della malaria, esponendo nuove popolazioni al rischio di infezione ³⁻⁷.

L'innalzamento del livello del mare, un'altra conseguenza del riscaldamento globale, può influire sulla distribuzione delle malattie infettive attraverso l'intrusione di acqua salata nelle risorse idriche costiere e la conseguente compromissione della qualità dell'acqua potabile. Inoltre, l'erosione costiera e la perdita di habitat possono spingere le popolazioni verso aree urbane sovraffollate, creando condizioni favorevoli alla diffusione di malattie contagiose. Un esempio emblematico è rappresentato dall'aumento della diffusione del *Vibrio cholerae* nelle aree costiere ⁸⁻¹⁰.

Le malattie trasmesse da vettori non sono le uniche a essere influenzate dai cambiamenti climatici. Anche le malattie respiratorie possono essere esacerbate dalle condizioni ambientali alterate. L'aumento della frequenza e dell'intensità degli incendi boschivi, legato ai cambiamenti climatici, produce una quantità significativa di particolato atmosferico, che può aggravare le malattie respiratorie croniche e aumentare la suscettibilità alle infezioni respiratorie. Il particolato fine può trasportare patogeni o creare un ambiente che facilita la loro sopravvivenza e trasmissione ¹¹⁻¹⁶.

Il cambiamento climatico ha anche un impatto sulla sicurezza alimentare, che a sua volta può influenzare la diffusione delle malattie infettive. Le variazioni nelle condizioni climatiche possono compromettere la produzione agricola, ridurre la disponibilità di cibo e aumentare la malnutrizione, rendendo le popolazioni più vulnerabili alle infezioni. Numerosi studi hanno evidenziato che la malnutrizione può

indebolire il sistema immunitario, aumentando il rischio di contrarre malattie infettive e la gravità delle infezioni¹⁷⁻²⁰.

Il cambiamento climatico non agisce da solo nel determinare la diffusione delle malattie infettive, ma interagisce con altri fattori ambientali e socioeconomici. La deforestazione, l'urbanizzazione non pianificata e la globalizzazione sono processi che, combinati con il cambiamento climatico, possono facilitare la trasmissione di patogeni. La deforestazione, per esempio, può alterare gli habitat naturali dei vettori e degli ospiti, costringendo gli animali a entrare in contatto più stretto con gli esseri umani e aumentando il rischio di zoonosi^{21,22}. La perdita di biodiversità può inoltre ridurre la capacità degli ecosistemi di controllare naturalmente i patogeni, favorendo la comparsa di nuove malattie infettive²³⁻²⁶.

Le strategie di mitigazione e adattamento sono cruciali per affrontare gli impatti del cambiamento climatico sulle malattie infettive. Le misure di mitigazione, come la riduzione delle emissioni di gas serra, possono limitare l'entità del riscaldamento globale e, di conseguenza, i suoi effetti sulla salute. Tuttavia, dato che alcuni cambiamenti climatici sono ormai inevitabili, le strategie di adattamento sono altrettanto essenziali. Queste includono il rafforzamento dei sistemi di sorveglianza delle malattie, lo sviluppo di modelli predittivi per identificare le aree a rischio, la promozione di pratiche agricole sostenibili e l'implementazione di misure di controllo dei vettori²⁷.

L'educazione e la sensibilizzazione delle comunità giocano un ruolo fondamentale nella prevenzione delle malattie infettive in un contesto di cambiamento climatico²⁸. La formazione riguardo ai comportamenti protettivi, come l'uso di zanzariere e repellenti, la gestione dell'acqua e l'igiene personale, può ridurre significativamente il rischio di infezione. Inoltre, la cooperazione internazionale e l'integrazione delle politiche di salute pubblica con le politiche ambientali e di sviluppo sono essenziali per affrontare in modo olistico le sfide poste dai cambiamenti climatici²⁹⁻³¹.

La ricerca scientifica continua a giocare un ruolo vitale nel comprendere le interazioni tra cambiamenti climatici e malattie infettive. Gli studi multidisciplinari che integrano climatologia, ecologia, epidemiologia e scienze sociali sono particolarmente utili per sviluppare strategie efficaci di prevenzione e controllo. La modellazione matematica e i sistemi di informazione geografica (GIS) sono strumenti potenti che possono aiutare a prevedere i focolai di malattie e a pianificare interventi mirati³²⁻³⁴.

Tra i patogeni di maggiore interesse sociale, e la cui diffusione è influenzata dal cambiamento climatico, vi è *Legionella* spp. La *Legionella* è un genere di batteri gram-negativi, tra cui *Legionella pneumophila*, responsabile della legionellosi, una malattia polmonare

potenzialmente grave. Il batterio è ubiquitario in ambienti acquatici, sia naturali che artificiali, e prospera in ambienti umidi e caldi come torri di raffreddamento, impianti idrici e piscine. Negli ultimi anni, i cambiamenti climatici hanno avuto un impatto significativo sulle modalità di trasmissione e diffusione della Legionella, contribuendo all'aumento della frequenza dei casi di infezione ^{35,36}.

Alla luce di numerosi eventi mediatici che hanno visto coinvolta la città metropolitana di Palermo, la presente tesi, esitante dal progetto condotto durante il triennio di dottorato di ricerca, ha avuto lo scopo di approfondire il fenomeno, stilando un'ipotesi di protocollo di sorveglianza al fine di prevenire la diffusione di Legionella spp.

1. Introduzione e Note Dottrinali

Nell'ambito dell'Agenda 2030, l'acqua rappresenta un elemento cruciale, spesso sottovalutato, ma essenziale per il raggiungimento dei molteplici Obiettivi di Sviluppo Sostenibile (SDG). La sua rilevanza trasversale implica che l'incapacità di adattarsi ai cambiamenti climatici non solo compromette il raggiungimento dell'Obiettivo 6, dedicato all'acqua pulita e ai servizi igienico-sanitari, ma ostacola anche la realizzazione di gran parte degli altri obiettivi. Sebbene l'Obiettivo 13, "Adottare misure urgenti per combattere i cambiamenti climatici e le loro conseguenze," definisca traguardi e indicatori specifici, manca un meccanismo formale che lo colleghi direttamente agli obiettivi stabiliti dall'Accordo di Parigi. Di conseguenza, spesso si assiste a processi paralleli che procedono in modo scollegato. Nonostante l'acqua non sia esplicitamente menzionata nell'Accordo di Parigi, essa costituisce una componente fondamentale di quasi tutte le strategie di mitigazione e adattamento ai cambiamenti climatici. Nei contributi determinati a livello nazionale (Nationally Determined Contributions, NDC), l'acqua emerge come una priorità primaria per le azioni di adattamento, trovando collegamenti diretti e indiretti con tutti gli altri ambiti prioritari. Analogamente, nel Quadro di Riferimento di Sendai per la Riduzione del Rischio di Disastri, l'acqua riceve scarsa attenzione esplicita, ma risulta intrinsecamente legata alle priorità di azione e gioca un ruolo centrale nel conseguimento di tutti i sette obiettivi previsti dal quadro. La gestione sostenibile delle risorse idriche, quindi, rappresenta un elemento imprescindibile per affrontare le sfide globali e promuovere un futuro resiliente e sostenibile. Negli ultimi cento anni, il consumo globale di risorse idriche è aumentato di sei volte, con una crescita che continua a un ritmo di circa l'1% annuo. Questo incremento è strettamente correlato alla crescita demografica, allo sviluppo economico e ai cambiamenti nei modelli di consumo. Tuttavia, a fronte di risorse idriche sempre più incerte e irregolari, il cambiamento climatico sta amplificando le condizioni di stress idrico, aggravando situazioni già critiche e introducendo fenomeni di scarsità anche in regioni tradizionalmente abbondanti di acqua. È importante sottolineare che la scarsità fisica di acqua, più che essere un fenomeno cronico, tende a manifestarsi in maniera stagionale. I cambiamenti climatici, infatti, stanno alterando la disponibilità idrica stagionale in diverse aree geografiche, generando nuove sfide nella gestione delle risorse idriche.

L'impatto del cambiamento climatico si manifesta attraverso un'intensificazione della frequenza e della magnitudine di eventi estremi, come ondate di calore, precipitazioni intense, tempeste e mareggiate³⁷. L'aumento delle temperature delle acque, inoltre, compromette la qualità delle risorse idriche, determinando una riduzione dell'ossigeno disciolto e, di

conseguenza, una diminuzione della capacità di autodepurazione dei corpi idrici. Fenomeni come inondazioni o siccità prolungate amplificano ulteriormente i rischi di contaminazione da agenti patogeni e di concentrazione di sostanze inquinanti, ponendo nuove sfide per la tutela della qualità e della sicurezza dell'acqua.

I cambiamenti climatici amplificano i rischi associati alle infrastrutture idriche, rendendo indispensabile l'implementazione di misure di adattamento efficaci. Gli eventi estremi legati all'acqua, la cui frequenza e intensità sono aggravate dai cambiamenti climatici, rappresentano una crescente minaccia per le risorse idriche e per i servizi igienico-sanitari (WASH, Water, Sanitation, and Hygiene). Danni ai sistemi igienico-sanitari, come l'inondazione delle stazioni di pompaggio delle acque reflue, possono provocare la dispersione di feci, virus e protozoi patogeni, generando gravi rischi per la salute pubblica e contaminazioni incrociate su larga scala³⁸³⁹.

Le infrastrutture per lo stoccaggio dell'acqua, come le dighe, richiedono una revisione approfondita in termini di sicurezza e sostenibilità. È necessario considerare interventi strutturali di miglioramento o, in casi specifici, il loro smantellamento, con l'obiettivo di minimizzare l'impatto ambientale e sociale e di ottimizzare l'efficienza dei servizi idrici. Queste azioni dovrebbero essere guidate da un approccio integrato che tenga conto delle dinamiche climatiche future e dei vincoli ecologici⁴⁰.

In molte regioni del mondo, le acque sotterranee rappresentano la principale riserva idrica, con una capacità di stoccaggio significativamente superiore rispetto ai bacini di acqua superficiale. Queste risorse sono generalmente più protette dalla variabilità climatica stagionale e interannuale, risultando meno vulnerabili agli impatti immediati dei cambiamenti climatici rispetto alle acque superficiali. Tuttavia, è fondamentale monitorare e gestire con attenzione queste risorse per garantire la loro sostenibilità a lungo termine e la resilienza dei sistemi idrici globali^{41,42}.

Tra i rischi più preoccupanti vi sono eventi meteorologici estremi, che possono mettere in crisi i sistemi sanitari, interrompere le filiere alimentari, causare sfollamenti di massa e aggravare la povertà. Questi fenomeni hanno il potenziale di annullare i progressi ottenuti nel campo della salute e dello sviluppo, compromettendo la resilienza delle comunità più vulnerabili. Di conseguenza, strategie di mitigazione integrate e tempestive rappresentano un elemento chiave per contrastare le minacce derivanti dai cambiamenti climatici e per garantire un futuro sostenibile e salubre per tutte le popolazioni³⁶.

Le principali cause dei cambiamenti climatici contribuiscono significativamente a un pesante carico globale di malattie, come evidenziato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità

(OMS, 2018b). Gli sforzi di mitigazione, volti a ridurre le emissioni di gas serra, sono fondamentali per preservare le condizioni sociali e ambientali necessarie a sostenere la salute pubblica nel lungo termine. Tali interventi non solo riducono l'impatto diretto delle emissioni sulla salute, ma sono indispensabili per prevenire rischi legati all'acqua che, pur essendo di natura incerta, possono avere conseguenze gravi e determinanti per la salute globale⁴³⁻⁴⁵.

1.1 Malattie trasmesse dall'acqua (Waterborne Diseases, WBD)

Le malattie trasmesse dall'acqua (Waterborne Diseases, WBD) continuano a rappresentare una priorità sanitaria globale, mantenendosi tra le principali cause di morbosità e mortalità a livello mondiale. Secondo le stime più recenti, oltre il 95% di queste patologie potrebbe essere prevenuto mediante adeguate misure di intervento, sottolineando l'urgenza di un'azione strategica mirata al loro controllo. L'eliminazione delle WBD rimane un obiettivo fondamentale per la comunità internazionale, in linea con le agende globali di sviluppo sostenibile. A partire dagli anni '70-'80, la ricerca scientifica si è concentrata prevalentemente sui rischi chimici associati alle acque potabili, con particolare attenzione alla presenza di sostanze tossiche come solventi clorurati ed erbicidi. Tuttavia, l'aspetto microbiologico delle contaminazioni è stato a lungo trascurato, nonostante il suo potenziale impatto devastante sulla salute pubblica^{46,47}.

Nei Paesi industrializzati, i progressi tecnologici hanno trasformato la gestione delle risorse idriche, migliorando significativamente la qualità dell'acqua destinata al consumo umano. Tecniche avanzate di trattamento, come la disinfezione, la chiariflocculazione e la filtrazione, hanno consentito di ridurre drasticamente i rischi microbiologici. Tali interventi hanno portato quasi all'eliminazione delle infezioni causate da patogeni "classici" come *Salmonella typhi* e *Vibrio cholerae*, riducendo la frequenza di epidemie di grande portata. Tuttavia, le tecnologie attualmente in uso mostrano limiti evidenti nell'affrontare nuove sfide legate alla proliferazione di patogeni emergenti e all'adattamento di alcuni microrganismi ai trattamenti convenzionali⁴⁸.

Negli ultimi anni, l'attenzione si è progressivamente spostata verso i rischi sanitari derivanti dalla presenza di microrganismi patogeni nelle risorse idriche, anche in quelle già sottoposte a trattamenti di potabilizzazione. L'aumento delle epidemie legate all'acqua potabile è stato attribuito a molteplici fattori, tra cui il sovrasfruttamento delle fonti idriche, il deterioramento delle infrastrutture di trattamento e distribuzione e la persistenza di fonti di contaminazione microbiologica, come reflui urbani, agricoli e industriali. Fenomeni come

l'eutrofizzazione, amplificati dai cambiamenti climatici, hanno ulteriormente aggravato la situazione, favorendo la crescita e la diffusione di agenti patogeni in ambienti acquatici⁴⁹⁻⁵¹.

Nonostante i significativi progressi nella riduzione dei rischi infettivi tradizionali, il panorama attuale presenta nuove problematiche. Tra queste, spicca la capacità di alcuni microrganismi, come *Legionella pneumophila*, di sviluppare una resistenza alle concentrazioni di cloro utilizzate nei trattamenti di disinfezione. Tali microrganismi rappresentano una minaccia emergente, con potenziali implicazioni per la salute pubblica. Inoltre, le malattie infettive “emergenti” includono patologie causate da nuovi agenti patogeni, come il ceppo *Escherichia coli* O157:H7, e malattie già note che mostrano un improvviso aumento dell'incidenza o una maggiore diffusione geografica. Infezioni da *Cryptosporidium parvum*, *Legionella* spp., *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* e *Calicivirus* sono state rilevate con maggiore frequenza in regioni come Stati Uniti, Canada ed Europa⁵².

I patogeni “opportunisti” aggiungono ulteriore complessità alla gestione sanitaria delle risorse idriche. Questi microrganismi, spesso commensali o saprofiti, trovano un habitat favorevole anche nelle acque e possono causare infezioni gravi in soggetti vulnerabili, come neonati, anziani e persone immunodepresse. Le classificazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) indicano che vi sono attualmente 175 specie di agenti infettivi emergenti appartenenti a 96 generi diversi, evidenziando l'ampiezza del fenomeno⁵³.

La centralizzazione della gestione idrica, sebbene abbia portato miglioramenti nella qualità dell'acqua in molte aree, ha contribuito a un aumento del numero di casi coinvolti nelle epidemie su larga scala. Parallelamente, i progressi nelle tecnologie diagnostiche e nel monitoraggio microbiologico hanno reso più evidente l'entità del problema, evidenziando la necessità di un approccio integrato che unisca innovazione tecnologica, monitoraggio continuo e politiche di prevenzione più incisive per garantire una gestione sostenibile delle risorse idriche e proteggere la salute pubblica.

Nel contesto attuale, è fondamentale riconoscere che i recenti avanzamenti nelle tecniche diagnostiche e nel controllo microbiologico delle matrici ambientali hanno migliorato la nostra capacità di rilevare contaminanti nell'acqua potabile. Tuttavia, nonostante questi progressi, l'incidenza delle patologie trasmesse dall'acqua nei Paesi industrializzati è probabilmente ancora sottostimata.

L'inadeguatezza dei servizi idrici e igienico-sanitari rappresenta una delle principali cause di malattie e mortalità prevenibili a livello globale, con un impatto stimato in quasi due milioni di decessi ogni anno e circa 123 milioni di anni di vita persi (DALY) a causa di morte prematura e disabilità (WHO, 2019). L'onere maggiore grava sui bambini di età inferiore ai

cinque anni, che risultano i più vulnerabili (Tabella 1). A partire dal 2000, si è registrata una significativa riduzione della mortalità associata a malattie legate all'acqua e ai servizi igienico-sanitari, parallelamente ai miglioramenti nell'accesso a fonti idriche sicure e a sistemi igienico-sanitari adeguati⁵⁴.

Nonostante i progressi nella riduzione della mortalità, il calo della morbilità è stato più lento e disomogeneo, con un impatto sociale ed economico che grava in modo sproporzionato su donne e ragazze. In molte comunità, il tempo impiegato nella raccolta dell'acqua, unito alla mancanza di strutture igienico-sanitarie adeguate, limita le opportunità di studio e lavoro per le donne. Inoltre, difficoltà legate alla gestione dell'igiene mestruale, come l'assenza di privacy o di strutture sicure, generano stigma sociale, ansia e isolamento. Questi fattori mettono in evidenza l'urgenza di adottare politiche inclusive e interventi mirati per affrontare non solo le conseguenze sanitarie ma anche le profonde disuguaglianze di genere legate alla gestione inadeguata delle risorse idriche e dei servizi igienico-sanitari⁵⁵.

Tabella 1. Carico di morbilità dovuto a servizi WASH inadeguati per l'anno 2016

Malattia	Decessi	DALY ('000)	Percentuale della popolazione (%)
Malattie diarroiche	828.651	49.774	0,60
Infezioni da elminti trasmessi dal suolo	6.248	3.431	1
Infezioni respiratorie acute	370.370	17.308	0,13
Malnutrizione	28.194	2.995	0,16
Tracoma	<10	244	1
Schistosomiasi	10.405	1.096	0,43
Filariosi linfatica	<10	782	0,67
Subtotale di acqua potabile, servizi igienico-sanitari e igiene	1.243.869	75.630	Non disponibile
Malaria	354.924	29.708	0,80
Dengue	38.315	2.936	0,95
Oncocerciasi	<10	96	0,10
Subtotale della gestione delle risorse idriche	393.239	32.740	Non disponibile
Annegamenti	233.890	14.723	0,73 (0,74 per i paesi a basso e medio reddito,

			0,54 per i paesi ad alto reddito)
Subtotale della sicurezza degli ambienti acquatici	233.890	14.723	Non disponibile
Totale dell'acqua e dei servizi igienico-sanitari inadeguati	1.870.998	123.093	Non disponibile

Nota: DALY: anni di vita in salute persi a causa di morte prematura e disabilità. Le stime per la diarrea, le infezioni respiratorie acute e gli annegamenti includono anche il carico di morbidità nei paesi ad alto reddito.

Include il carico di morbidità da malnutrizione proteico-energetica (PEM) e le conseguenze solo nelle bambine e nei bambini sotto i cinque anni.

L'Accordo di Parigi del 2015 ha evidenziato che i cambiamenti climatici stanno già esercitando un impatto significativo sulla salute umana, aumentando l'esposizione e la vulnerabilità a livello globale. Anche un aumento della temperatura media mondiale di 1,5°C è considerato incompatibile con condizioni di sicurezza per la salute umana. Le popolazioni più svantaggiate, vulnerabili e in condizioni di povertà estrema sono le più colpite, subendo effetti sproporzionati. I cambiamenti climatici, quindi, agiscono come un amplificatore della povertà, con il potenziale di spingere circa 100 milioni di persone nella povertà estrema entro il 2030⁵⁶. Gli effetti diretti sulla salute includono conseguenze fisiologiche dovute all'esposizione a temperature elevate, un aumento delle malattie e lesioni respiratorie e cardiovascolari, e mortalità legata a eventi meteorologici estremi come siccità, inondazioni, ondate di calore, tempeste e incendi. Gli impatti indiretti derivano da cambiamenti ecologici, come la riduzione della sicurezza alimentare e idrica, la diffusione di malattie infettive sensibili al clima, e da risposte sociali quali sfollamenti e accesso ridotto ai servizi sanitari. Inoltre, gli eventi meteorologici estremi, le migrazioni legate al clima e la perdita di identità culturale possono avere conseguenze durature sulla salute mentale, spesso persistendo per tutta la vita. Gli effetti indiretti dei cambiamenti climatici, essendo il risultato di complessi meccanismi causali, sono particolarmente difficili da prevedere e mitigare⁵⁷⁻⁵⁹.

Le malattie maggiormente aggravate dai cambiamenti climatici comprendono patologie di origine alimentare, idrica e trasmesse da vettori, che diventano particolarmente critiche in seguito a inondazioni. Inoltre, eventi come inondazioni e siccità, sia costiere sia interne, sono associati a lesioni e decessi. L'aumento dell'esposizione a patogeni, tossine o sostanze chimiche nell'acqua potabile, insieme alla malnutrizione derivante dalla perdita di raccolti, rappresenta un ulteriore rischio sanitario. Le persone impiegate in occupazioni particolarmente esposte a

tali rischi, come l'agricoltura, sono tra le categorie più vulnerabili agli effetti dei cambiamenti climatici sulla salute^{60,61}.

Questa situazione evidenzia la necessità di potenziare i sistemi di sorveglianza e di armonizzare le procedure di segnalazione tra i Paesi europei, al fine di ottenere una valutazione più accurata dell'incidenza delle malattie trasmesse dall'acqua e di implementare interventi efficaci per la tutela della salute pubblica.

1.1.1 Malattie trasmesse dall'acqua

Negli ultimi decenni, il consumo globale di acqua ha registrato un aumento costante, trainato dall'espansione degli utilizzi nei settori civile, industriale e agricolo. Questa crescita continua riflette una crescente domanda di risorse idriche in risposta ai cambiamenti demografici e alle esigenze di sviluppo economico.

Per quanto riguarda l'uso civile dell'acqua, è importante distinguere tra acqua potabile e acqua destinata a usi non potabili. L'acqua potabile, sia essa trattata o lasciata nella sua forma naturale, è destinata al consumo umano diretto come alimento, alla preparazione degli alimenti, e alla pulizia di utensili e attrezzature che entrano in contatto con prodotti alimentari. Per soddisfare tali scopi, deve rispettare standard rigorosi di qualità microbiologica, chimica e fisica per garantire la sicurezza sanitaria⁶².

D'altra parte, le acque non potabili sono prevalentemente utilizzate per scopi ricreativi, un settore che ha visto una crescente popolarità a livello globale grazie alla varietà di attività a esso collegate. Questa categoria comprende acque utilizzate in piscine, incluse vasche idromassaggio e impianti termali, così come in fontane decorative. Inoltre, rientrano in questa definizione anche le acque naturali di ambienti marini e dolci, come laghi, fiumi e torrenti, utilizzate per attività ricreative e sportive. Questi utilizzi richiedono monitoraggi specifici per garantire la sicurezza e la sostenibilità delle risorse idriche impiegate^{63,64}.

Le acque destinate all'uso civile possono essere suddivise in due categorie principali in base ai trattamenti a cui vengono sottoposte:

- **Acque non trattate:** Questa categoria include le acque minerali naturali, che non necessitano di alcun trattamento in quanto già dotate di caratteristiche qualitative ottimali, e le acque di mari, fiumi e laghi, che non vengono sottoposte a trattamenti specifici per via della loro natura o utilizzo.

- Acque trattate: Comprendono tutte le acque sottoposte a processi di potabilizzazione per migliorarne le proprietà chimico-fisiche e microbiologiche. In questa categoria rientrano le acque distribuite attraverso la rete idrica, quelle utilizzate in piscine e alcune fontane decorative. Questi trattamenti mirano a garantire la sicurezza per il consumo umano e per scopi ricreativi.

Tra i metodi di disinfezione più comuni figura la clorazione, un processo che elimina agenti patogeni, quali batteri e virus, mediante la distruzione dei legami chimici nelle loro molecole. Questo metodo offre il vantaggio di mantenere un'azione protettiva durante il trasporto dell'acqua grazie alla presenza di residui di cloro disciolto. Tuttavia, il trattamento con cloro non è privo di limiti: alcuni microrganismi dimostrano una resistenza al cloro che può protrarsi per diverse ore o persino giorni, e talvolta possono verificarsi carenze di cloro residuo o condizioni che ne riducono l'efficacia⁶⁵.

Sia le acque trattate che quelle non trattate possono essere soggette a contaminazione microbiologica. Tuttavia, affinché un rischio biologico si traduca in un evento patologico, devono verificarsi due condizioni essenziali: la trasmissione dell'agente infettivo dall'acqua all'organismo ospite e la presenza di una suscettibilità da parte di quest'ultimo a sviluppare l'infezione. Questi fattori sottolineano l'importanza di una gestione rigorosa della qualità delle acque per prevenire rischi per la salute pubblica^{66,67}.

Le acque destinate a uso industriale e agricolo possono essere classificate in base alla loro origine e al trattamento subito per adattare agli specifici requisiti dei processi in cui vengono impiegate. Per uso industriale, le acque possono essere suddivise in acque grezze e acque trattate. Le acque grezze provengono direttamente da fonti naturali come fiumi, laghi o falde acquifere e vengono utilizzate senza trattamenti significativi, principalmente in processi che non richiedono specifici standard di qualità, come il raffreddamento industriale o la generazione di vapore. Le acque trattate, invece, sono sottoposte a processi di purificazione, come la desalinizzazione, la demineralizzazione o la rimozione di particolato, per rispondere alle esigenze di settori che richiedono standard qualitativi più elevati, come l'industria farmaceutica, alimentare o elettronica⁶⁸.

In ambito agricolo, l'acqua è generalmente classificata in base alla sua idoneità per l'irrigazione e all'origine. Le acque di irrigazione possono includere acqua dolce proveniente da fonti superficiali o sotterranee, acqua piovana raccolta e stoccata, e acque reflue trattate, che stanno acquisendo un'importanza crescente nell'ambito dell'agricoltura sostenibile. L'uso delle acque reflue trattate, in particolare, richiede che vengano rispettati rigorosi standard qualitativi per evitare contaminazioni del suolo, delle colture e, indirettamente, della salute umana. La

sceita del tipo di acqua da impiegare dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche, come il contenuto salino e la presenza di nutrienti, che possono influenzare la resa agricola e la salubrità dei prodotti coltivati^{69,70}.

1.1.2 Le acque come sorgenti di microrganismi

Le diverse categorie di acqua, sebbene non necessariamente contaminate alla fonte, possono subire processi di contaminazione microbiologica dovuti a molteplici fattori, specifici per ciascun tipo di acqua.

Per quanto riguarda le acque potabili, in particolare quelle distribuite attraverso la rete idrica, un numero considerevole di malattie è associato a inefficienze nei sistemi di distribuzione. Sebbene l'acqua trattata nei sistemi di potabilizzazione sia generalmente di alta qualità microbiologica, contaminazioni possono verificarsi lungo il percorso distributivo, causando alterazioni che si manifestano all'utenza. L'aumento della carica microbiologica durante la distribuzione può derivare da contaminazioni croniche o episodiche dell'acqua, riconducibili a diversi fattori⁷¹.

Uno dei principali problemi è rappresentato dai guasti meccanici nelle infrastrutture. Batteri e altri microrganismi possono penetrare nella rete di distribuzione attraverso serbatoi aperti, perdite nelle condutture dovute all'usura o alla vetustà dei materiali, oppure durante i lavori di installazione di nuove tubazioni che interferiscono con il sistema esistente. Un altro fattore critico è la variazione della pressione dell'acqua all'interno della rete, che può causare fenomeni di aspirazione di acqua contaminata dall'esterno attraverso fessure o punti di debolezza nelle tubazioni. Questo rischio è particolarmente elevato quando le tubature si trovano interrate e in prossimità di reti fognarie non adeguatamente isolate⁷².

In alcuni casi, la contaminazione può derivare direttamente dall'acqua trattata, a causa del fenomeno noto come "breakthrough", in cui microrganismi presenti nell'acqua grezza riescono a superare i processi di potabilizzazione. Tra questi, protozoi, virus e batteri possono eludere i trattamenti grazie alla loro resistenza a specifici metodi di disinfezione. Inoltre, è stato osservato che il processo di trattamento stesso può esercitare una pressione selettiva, favorendo la sopravvivenza di patogeni con strategie di adattamento evolute⁷³.

Alcuni microrganismi, pur subendo danni durante la potabilizzazione, entrano in uno stato di quiescenza che impedisce la loro crescita nei terreni di coltura tradizionali, una condizione nota come "viable but non culturable" (VBNC). Questo fenomeno è stato documentato prevalentemente nei batteri del gruppo dei coliformi, ma è stato osservato anche in specie

patogene come *Legionella pneumophila*. Questi aspetti evidenziano la complessità della gestione microbiologica delle acque potabili e la necessità di monitoraggi e interventi costanti per garantire la sicurezza della rete distributiva ¹⁹.

Le cellule di *Legionella* spp. in stato VBNC (Viable But Non Culturable) rappresentano una minaccia significativa per la salute pubblica, poiché, in condizioni ambientali più favorevoli, possono riprendere la loro capacità di crescita e proliferazione. I batteri danneggiati, sebbene non riescano a crescere su terreni selettivi, producendo risultati "falsi negativi" nelle analisi microbiologiche, possono sopravvivere all'interno della rete di distribuzione. In ambienti protetti e nutrienti, come i fondi rete, i tubercoli, i depositi nelle tubature o i biofilm, spesso caratterizzati da basse concentrazioni di cloro residuo, questi batteri possono rigenerarsi, riacquistare vitalità e riprendere la capacità di moltiplicarsi ⁷⁴.

Indipendentemente dalla loro origine nell'acqua potabile, i microrganismi possono proliferare nella rete di distribuzione. Questo fenomeno, noto come "crescita nella rete di distribuzione", si verifica in seguito a eventi come il breakthrough o incidenti di contaminazione. Quando si tratta di microrganismi danneggiati ma vitali (injured), il processo è indicato come "ricrescita"⁷⁵.

La proliferazione batterica all'interno della rete idrica favorisce la formazione di biofilm, strutture complesse composte da cellule microbiche, materiali extracellulari, e residui organici e inorganici. I biofilm non solo contribuiscono all'occlusione e alla corrosione delle tubature, rendendo necessaria una manutenzione costante o, in casi estremi, la sostituzione delle infrastrutture, ma fungono anche da riserva di nutrienti e protezione per i microrganismi. Questa protezione riduce l'efficacia dei disinfettanti utilizzati nel processo di potabilizzazione. Inoltre, i biofilm rappresentano un ambiente favorevole per il trasferimento di geni di virulenza e resistenza agli antibiotici tra i batteri⁷⁶.

Anche la maggior parte dei virus idrodiffusi mostra una resistenza significativa ai trattamenti di disinfezione con cloro. Questa resistenza rende difficile la loro completa eliminazione dall'acqua potabile, sottolineando la necessità di adottare strategie di trattamento e monitoraggio più efficaci per garantire la sicurezza della rete idrica.

La contaminazione dell'acqua potabile può derivare da incidenti durante il processo di potabilizzazione o da particolari caratteristiche dell'acqua grezza utilizzata come fonte. In alcuni casi, l'acqua grezza può presentare livelli di contaminazione così elevati che il trattamento non riesce a ridurre completamente la carica microbica o chimica. Inoltre, caratteristiche fisiche come l'elevata presenza di solidi disciolti o sospesi possono interferire con l'efficacia dei processi di disinfezione. Anche la composizione chimica dell'acqua, sia di

origine naturale sia legata ad attività antropogeniche, può ostacolare le reazioni chimiche necessarie durante il trattamento. Un ulteriore problema è rappresentato dai patogeni associati a organismi superiori, come alghe, protozoi o vermi, che possono essere protetti dall'azione dei disinfettanti⁷⁷⁻⁷⁹.

Una volta che i microrganismi accedono alla rete di distribuzione, possono proliferare o rigenerarsi, specialmente in aree caratterizzate da ristagni d'acqua, come serbatoi o tratti di tubazioni con scarsa circolazione, dove la concentrazione di cloro residuo è spesso insufficiente. Questa crescita può avvenire sia sulle superfici interne delle condutture, attraverso la formazione di biofilm, sia direttamente nell'acqua, come nel caso di batteri planctonici o associati a particelle sospese. La proliferazione è particolarmente evidente nei batteri eterotrofi, che comprendono anche specie patogene e che necessitano di composti organici come fonte di energia. La loro crescita è influenzata da fattori quali la temperatura, il tempo di permanenza dell'acqua nelle tubature o nei serbatoi, l'efficacia della disinfezione e la disponibilità di nutrienti, in particolare il carbonio organico assimilabile, una frazione del carbonio organico totale facilmente utilizzabile dai microrganismi⁸⁰.

Un'altra categoria di acque di interesse, specialmente nei paesi occidentali, è quella destinata all'uso ricreativo, come piscine e vasche idromassaggio, molto diffuse per attività sportive e ricreative. Le piscine, in particolare, possono ospitare un numero elevato di bagnanti rispetto al volume d'acqua, aumentando significativamente la concentrazione di microrganismi introdotti per unità di volume. Sebbene le piscine trattate con cloro siano generalmente considerate sicure, la qualità dell'acqua dipende strettamente dal mantenimento dei livelli appropriati di disinfettante e di pH. Tuttavia, condizioni come elevate temperature e la continua agitazione dell'acqua rendono difficile mantenere un residuo di cloro adeguato e un pH stabile (idealmente compreso tra 5,5 e 7,5), compromettendo così la qualità microbiologica dell'acqua. Nonostante la clorazione sia efficace nel ridurre la concentrazione di batteri fecali, risulta inefficace contro alcuni protozoi parassiti, come *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia* e amebe, oltre che contro virus resistenti come il virus dell'epatite A e il Norovirus. Questi microrganismi mostrano una resistenza elevata ai livelli di cloro comunemente utilizzati nelle piscine trattate, richiedendo quindi ulteriori strategie di controllo e monitoraggio per garantire la sicurezza microbiologica delle acque ricreative^{81,82}.

Le epidemie idrodifuse legate a sistemi idrici clorati sono più frequentemente attribuibili a specifici microrganismi piuttosto che a batteri di origine fecale. Un esempio rilevante è rappresentato dalle piscine con acque termali o con caratteristiche particolari, spesso sottoposte a trattamenti minimi o esclusivamente fisici al fine di preservare le proprietà naturali

dell'acqua. Tuttavia, questa pratica comporta un rischio microbiologico più elevato per i fruitori, dovuto sia alla presenza di patogeni nell'acqua sia alla possibilità di trasmissione interpersonale⁸³.

La situazione delle acque ricreative non trattate, come mari, laghi, fiumi e torrenti, presenta dinamiche differenti. In questi bacini naturali, le principali fonti di contaminazione derivano da scarichi fognari e industriali non trattati, oltre che da sversamenti accidentali o intenzionali di varia origine (www.epicentro.iss.it). Anche i bagnanti possono contribuire alla contaminazione microbiologica, sebbene le concentrazioni riscontrate siano generalmente inferiori rispetto a quelle rilevate nelle piscine. Inoltre, acque provenienti da allevamenti intensivi e il dilavamento di superfici urbane durante le precipitazioni aggiungono ulteriori carichi contaminanti, tra cui sostanze chimiche e materiale fecale di origine animale (www.epicentro.iss.it). Il trasporto di questi contaminanti segue il percorso delle acque superficiali, passando attraverso le reti fognarie fino a raggiungere i fiumi, i laghi e le aree costiere^{84,85}.

La diffusione di microrganismi e altre sostanze inquinanti è influenzata dal flusso dell'acqua, che può variare in base alle precipitazioni e alle caratteristiche idrogeologiche del territorio. Durante eventi di maggiore portata idrica o agitazione delle acque, contaminanti presenti nei sedimenti possono tornare in sospensione, aumentando il rischio di esposizione.

La sopravvivenza dei microrganismi in questi ambienti acquatici è determinata da una serie di fattori, tra cui temperatura, intensità della luce solare, salinità e altre proprietà chimico-fisiche dell'acqua. Poiché questi corpi idrici non subiscono alcun trattamento di disinfezione, la proliferazione microbica è regolata esclusivamente dalle condizioni ambientali locali, che possono favorire o limitare la crescita dei patogeni⁸⁶.

1.1.3 Fattori di rischio per le Waterborne Diseases

Numerosi fattori di natura generale contribuiscono sia all'emergere di nuovi microrganismi patogeni sia alle variazioni nella diffusione delle infezioni tra le popolazioni di diversi Paesi. Nei Paesi industrializzati, i cambiamenti demografici hanno un impatto significativo sulla diffusione delle malattie infettive. In particolare, l'aumento dell'età media della popolazione e la crescita dell'incidenza di condizioni che compromettono il sistema immunitario hanno portato a un incremento dei soggetti suscettibili a patogeni opportunisti. Questi fattori includono l'invecchiamento della popolazione e l'aumento di patologie o condizioni di immunosoppressione, come malattie genetiche, infezione da HIV, trapianti

d'organo e trattamenti per patologie oncologiche e reumatiche, tutti correlati all'allungamento della speranza di vita^{87,88}.

Molti dei patogeni responsabili di malattie trasmesse dall'acqua (Waterborne Diseases, WBD) possono essere considerati "nuovi" per le loro caratteristiche peculiari. Tra queste, spiccano la capacità di sviluppare rapidamente resistenza a uno o più antibiotici e la predisposizione a trasferire tra loro i geni che determinano la patogenicità, noti come "isole di patogenicità". Un esempio emblematico è rappresentato dal ceppo enteroemorragico di *Escherichia coli* (EHEC), che si ritiene abbia acquisito geni di virulenza tramite meccanismi di trasferimento genico, come la lisogenia. L'emergere di nuovi organismi patogeni è anche strettamente legato a cambiamenti ecologici provocati da attività economiche e agricole. Pratiche come il disboscamento, la fertirrigazione e il riutilizzo delle acque reflue in agricoltura hanno determinato modificazioni profonde negli ecosistemi, influenzando la distribuzione e la diffusione dei microrganismi. Un altro elemento rilevante è l'intensificazione dei viaggi internazionali. Già nel 1990 si registravano 280 milioni di passeggeri sulle rotte aeree internazionali, un numero salito a 600 milioni nel 2000, evidenziando il ruolo crescente della mobilità globale nella diffusione di agenti infettivi^{87,89,90}.

Inoltre, i cambiamenti negli stili di vita e l'adozione di nuove abitudini comportamentali hanno contribuito alla diffusione di alcune infezioni. Ad esempio, l'uso sempre più diffuso della doccia al posto della vasca da bagno e l'impiego di impianti di climatizzazione favoriscono la formazione di aerosol contenenti *Legionella pneumophila* e *Mycobacterium avium*, aumentando così il rischio di trasmissione di queste infezioni⁹¹⁻⁹³.

Di fatto, la capacità dei vettori di trasmettere malattie infettive è in costante aumento, influenzata significativamente dal riscaldamento delle temperature dell'acqua, che favorisce le condizioni ottimali per la loro riproduzione. Questo fenomeno riguarda vettori responsabili della diffusione di patologie come malaria, dengue, febbre del Nilo occidentale, malattia di Lyme e altre malattie tropicali trascurate. L'aumento delle temperature sta inoltre permettendo a tali vettori, inclusi insetti e altri animali, di colonizzare aree geografiche precedentemente inadatte alla loro sopravvivenza, come alcune regioni dell'Europa e del Nord America. Un esempio significativo è rappresentato dalle zanzare, principali vettori della febbre dengue, la cui capacità di trasmissione è aumentata di circa il 10% dagli anni '50. Similmente, la diffusione della malaria è destinata a intensificarsi nelle regioni confinanti con le attuali aree endemiche, mentre nelle zone già colpite si prevede che i cambiamenti saranno meno evidenti.

In aggiunta, l'interazione tra i cambiamenti climatici e la crescita demografica amplifica l'impatto delle infrastrutture idriche, come le dighe, che fungono da habitat di riproduzione per

le zanzare. Questa situazione è particolarmente preoccupante in Africa subsahariana, dove si prevede un aumento significativo nella diffusione della malaria legato alla presenza di queste strutture. L'ampio utilizzo dell'acqua e la sua diversificata gamma di applicazioni rendono altamente probabile l'esposizione a microrganismi contaminanti eventualmente presenti. Tuttavia, la probabilità di contrarre una malattia idrodiffusa varia in base a una serie di fattori, che consentono di identificare categorie di individui maggiormente a rischio di infezioni trasmesse dall'acqua ^{94,95}.

Tra i principali fattori di rischio si annoverano:

- Caratteristiche dell'acqua utilizzata: Queste comprendono sia parametri microbiologici, come la presenza di specifiche specie patogene e la loro concentrazione, sia parametri chimico-fisici. Ad esempio, la temperatura dell'acqua e il livello di cloro o altri disinfettanti possono influenzare direttamente la qualità microbiologica e la sicurezza dell'acqua.
- Stato immunitario degli individui: Alcuni gruppi di popolazione, come neonati, anziani e soggetti immunodepressi, sono particolarmente vulnerabili alle infezioni causate da microrganismi idrodiffusi. In contesti sanitari, la qualità microbiologica dell'acqua e delle reti di distribuzione è di cruciale importanza, in particolare nelle unità che ospitano pazienti immunocompromessi, come quelle di terapia intensiva, trapianti e oncologia.
- Durata dell'esposizione: Il rischio di infezione aumenta proporzionalmente al tempo trascorso in contatto con corpi idrici contaminati. Esposizioni prolungate, come quelle che si verificano durante attività ricreative acquatiche, possono incrementare significativamente il rischio.
- Modalità d'uso dell'acqua: Alcuni comportamenti amplificano il rischio di infezione, in particolare quelli che comportano l'ingestione accidentale di acqua contaminata. Attività ricreative e sportive in ambienti acquatici, soprattutto a livello agonistico, presentano un rischio maggiore non solo per l'ingestione, ma anche per la durata del contatto con l'acqua. Le gastroenteriti sono tra le infezioni più frequentemente riportate tra i frequentatori di piscine, dove l'ingestione involontaria di acqua contaminata rappresenta una delle principali cause.

Oltre ai pazienti immunocompromessi, anche i bambini sono considerati una categoria ad alto rischio per le malattie idrodiffuse. Ciò è dovuto sia alla maggiore frequenza con cui utilizzano le acque ricreative sia alla loro tendenza a trascorrere periodi più lunghi in queste

attività. Il comportamento ludico stesso spesso porta all'ingestione accidentale di acqua contaminata, aumentando ulteriormente il rischio di infezioni.

La valutazione del rischio microbiologico associato all'acqua varia notevolmente tra Paesi, poiché l'epidemiologia delle malattie idrodiffuse dipende da una combinazione di fattori che possono favorire o limitare la diffusione di specifici patogeni. Tra questi fattori figurano la presenza o assenza di determinati microrganismi in una regione, le loro caratteristiche intrinseche (come resistenza, infettività e dose infettante) e le condizioni climatiche che possono influenzarne la sopravvivenza e, in alcuni casi, la proliferazione⁹⁴.

1.2. Patogeni causa di Waterborne Diseases

Le malattie idrodiffuse sono trasmesse da una varietà di microrganismi, che includono patogeni emergenti, riemergenti e opportunisti, appartenenti ai tre principali gruppi: batteri, virus e protozoi. Questi agenti patogeni sono responsabili di una gamma diversificata di condizioni cliniche, che spaziano da disturbi gastrointestinali a gravi complicanze respiratorie, fino a esiti letali nei soggetti più vulnerabili, come quelli immunocompromessi.

Tra i microrganismi più frequentemente riscontrati nelle acque, i batteri occupano un ruolo predominante. Molti dei batteri patogeni trasmessi attraverso l'acqua hanno un'origine fecale, come *Campylobacter* spp., *E. coli* O157:H7 e *Helicobacter pylori*. Vi sono inoltre specie batteriche ambientali, come *Aeromonas* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella* spp. e *Mycobacterium* spp., capaci di proliferare sia nell'acqua sia nelle reti di distribuzione idrica, con una particolare prevalenza di bacilli gram-negativi non fermentanti⁹⁶.

I patogeni opportunisti che popolano acque e ambienti umidi possono rappresentare fino al 30% della comunità batterica presente in tali habitat. Questi microrganismi condividono caratteristiche che ne facilitano la sopravvivenza e la diffusione, tra cui:

- capacità di vivere e proliferare in ambienti esterni all'ospite;
- adattamento a crescere in acqua e ambienti umidi con basse concentrazioni di nutrienti;
- formazione di biofilm altamente resistenti ai trattamenti di disinfezione, comprese alte temperature e biocidi chimici;
- resistenza a un'ampia gamma di antibiotici.

Diversamente, i virus (ad esempio Rotavirus e Calicivirus) e i protozoi enterici trasmessi attraverso l'acqua (*Cryptosporidium parvum*, *Giardia duodenalis*) non sono in grado di moltiplicarsi nelle acque. Tuttavia, questi microrganismi si caratterizzano per una dose

infettante estremamente bassa, che può variare da poche unità a decine, e per una resistenza significativa sia all'ambiente acquatico sia ai processi di potabilizzazione. I protozoi, in particolare, sono in grado di formare strutture protettive, note come cisti, che li rendono altamente resistenti ai trattamenti di disinfezione e favoriscono la diffusione di malattie⁹⁷.

Tra i patogeni emergenti, *Legionella pneumophila* rappresenta un caso emblematico. Questo batterio, agente causale della legionellosi, è una grave infezione respiratoria associata a un'elevata mortalità ed è considerato un problema di sanità pubblica in crescita. I casi notificati sono in aumento, anche in Italia, e il batterio è ubiquitario negli ambienti acquatici sia naturali (come laghi, corsi d'acqua e sorgenti termali) sia artificiali (sistemi idrici urbani, impianti di edifici, piscine e sistemi di climatizzazione). La trasmissione avviene principalmente attraverso l'inalazione di aerosol generati da acqua contaminata⁹⁸.

Data la gravità della legionellosi, l'infezione è sottoposta a sorveglianza speciale da parte dell'Organizzazione Mondiale della Sanità e dell'Unione Europea. In Italia, è obbligatorio notificare i casi di legionellosi come malattia di classe II. Inoltre, il monitoraggio è supportato da un sistema nazionale di segnalazione, che raccoglie dati dettagliati in un registro gestito dall'Istituto Superiore di Sanità.

1.3 Legionella spp.

Dalla scoperta iniziale della Malattia del Legionario negli anni '70, la comprensione del suo agente eziologico ha portato a significativi avanzamenti nella microbiologia e nella tassonomia batterica. L'identificazione e la caratterizzazione dei ceppi isolati da pazienti hanno portato alla definizione del genere *Legionella*, appartenente alla famiglia delle Legionellaceae. Questa famiglia è stata riconosciuta come parte della divisione gamma dei Proteobacteria, grazie a studi di ibridizzazione del DNA e analisi filogenetiche basate sull'RNA ribosomiale 16S. Inizialmente, alcune analisi genomiche avevano suggerito una suddivisione della famiglia in tre distinti generi (*Legionella*, *Fluoribacter* e *Tatlockia*), basandosi su bassi valori di ibridizzazione tra determinate specie. Tuttavia, ulteriori ricerche hanno evidenziato che le Legionellaceae formano un sottogruppo omogeneo, caratterizzato da un'alta somiglianza genetica interna (>95%) e una chiara distinzione tra specie, con una somiglianza del DNA interspecifica inferiore al 70%. Questo ha confermato l'appartenenza delle Legionellaceae a un'unica famiglia tassonomica, pur mantenendo un elevato livello di diversità intra-genere⁹⁸. Filogeneticamente, il parente più prossimo delle Legionellaceae è *Coxiella burnetii*, agente causale della febbre Q. Entrambi i batteri condividono una strategia di vita intracellulare obbligata e possiedono geni associati alla sopravvivenza e replicazione all'interno delle cellule ospiti. Studi molecolari hanno rivelato un'evoluzione convergente nei meccanismi di infezione, indicando una stretta relazione funzionale oltre che genetica. Ad oggi, il genere *Legionella* comprende oltre 50 specie riconosciute e almeno 16 sierogruppi di *Legionella pneumophila*, che rappresenta la specie di maggiore rilevanza clinica. Questo batterio è ubiquitario e colonizza un'ampia gamma di ambienti naturali (laghi, fiumi, sorgenti termali, bacini idrici) e artificiali (sistemi idrici urbani, piscine, impianti di climatizzazione, e reti idriche di edifici). La sua capacità di adattarsi a diverse condizioni ambientali è facilitata dalla formazione di biofilm, strutture complesse che offrono protezione dai disinfettanti chimici e consentono la sopravvivenza in condizioni di nutrienti limitati (Tabella 2).

Tabella 2. Principali specie di Legionella, patologie associate e loro distribuzione

Legionella Species	Associated Diseases	Geographic Distribution
<i>Legionella pneumophila</i>	Legionnaires' disease, Pontiac fever	Worldwide, higher prevalence in industrialized countries

<i>Legionella longbeachae</i>	Legionnaires' disease	Australia, New Zealand, USA, Europe
<i>Legionella micdadei</i>	Pittsburgh pneumonia, Legionnaires' disease	North America, Europe
<i>Legionella bozemanai</i>	Legionnaires' disease, respiratory infections	North America, Europe
<i>Legionella dumoffii</i>	Legionnaires' disease, respiratory infections	Worldwide
<i>Legionella anisa</i>	Legionnaires' disease, Pontiac fever	Worldwide
<i>Legionella feeleii</i>	Pontiac fever	North America, Europe
<i>Legionella jordanis</i>	Respiratory infections	Worldwide

Un aspetto emergente di particolare interesse è rappresentato dai patogeni amebici legionella-simili (*Legionella*-like amoebal pathogens, LLAPs). Questi microrganismi, pur condividendo alcune caratteristiche con *Legionella* spp., presentano differenze significative, tra cui l'incapacità di crescere nei terreni di coltura standard. Essi necessitano di specifici ospiti amebici per la loro proliferazione, rendendone difficile l'identificazione e lo studio. Tra questi, un ceppo LLAP isolato dallo sputo di un paziente affetto da polmonite tramite arricchimento in *Amoeba* è stato identificato come un raro patogeno umano.

Sebbene alcuni ceppi di LLAPs siano stati recentemente riclassificati come appartenenti al genere *Legionella*, rimangono numerose difficoltà nell'isolarli con metodiche tradizionali. Questa limitazione metodologica rappresenta una barriera per una completa comprensione della loro distribuzione, della loro rilevanza patogena e del loro ruolo epidemiologico. Inoltre, la loro capacità di sopravvivere in ambienti avversi, spesso sfruttando cisti amebiche come habitat protettivo, rende questi microrganismi resistenti ai trattamenti di disinfezione e particolarmente difficili da eradicare.

Le infezioni causate da *Legionella* spp. e dai patogeni amebici legionella-simili rappresentano una crescente preoccupazione per la salute pubblica, in particolare a causa della loro capacità di proliferare in ambienti artificiali e della loro diffusione tramite aerosol contaminati. La legionellosi è sottoposta a sorveglianza speciale da parte dell'Organizzazione Mondiale della Sanità e dell'Unione Europea, con l'obbligo di notifica in molti Paesi, tra cui l'Italia, dove è classificata come malattia di classe II. Un sistema nazionale di sorveglianza

raccoglie dati epidemiologici dettagliati attraverso il registro dell'Istituto Superiore di Sanità, al fine di monitorare e controllare la diffusione della malattia^{99,100}.

Le sfide future riguardano l'implementazione di metodi diagnostici più sensibili per identificare ceppi non coltivabili con tecniche tradizionali, lo sviluppo di protocolli di sanificazione più efficaci contro i biofilm, e l'adozione di strategie di monitoraggio adattate ai cambiamenti climatici, che stanno alterando significativamente le condizioni ambientali favorevoli alla proliferazione di questi microrganismi. La continua espansione della conoscenza tassonomica e genetica delle Legionellaceae e dei LLAPs sarà fondamentale per migliorare le politiche di sanità pubblica e prevenire epidemie future.

1.3.1 Caratteristiche microbiologiche

La famiglia delle Legionellaceae, costituita esclusivamente dal genere *Legionella*, comprende attualmente oltre 50 specie suddivise in più di 70 sierogruppi. Per la specie di maggiore rilevanza clinica, *Legionella pneumophila*, sono stati identificati almeno 16 sierogruppi. Questi batteri sono cocco-bacilli Gram-negativi con dimensioni variabili: nei tessuti e nei campioni clinici misurano generalmente tra 1 e 2 µm, mentre nei terreni di coltura possono presentare forme filamentose allungate fino a 20 µm. Per il loro isolamento e crescita ottimale, sia da campioni ambientali sia clinici, è necessario fornire ferro solubile e aminoacidi come fonte energetica, in sostituzione dei carboidrati comunemente utilizzati da altri batteri acquatici. Il terreno di crescita preferenziale è il BCYE α (Buffered Charcoal Yeast Extract) agar, arricchito con L-cisteina, ferro, α -chetoglutarato e carbone attivo, tamponato con N-2-acetamino-2-acido aminoetansulfonico (ACES) per mantenere un pH ottimale di 6,9. Alcune specie rare, come *L. jordanis*, *L. oakridgensis* e *L. spiritensis*, possono perdere la dipendenza dalla L-cisteina dopo passaggi seriali attraverso ospiti infetti.

Il genere *Legionella* è costituito da batteri asporigeni e aerobi obbligati, con un intervallo di crescita che varia tra 20°C e 42°C, con un'ottima proliferazione a 35°C in atmosfera umida. Le colonie su terreni selettivi mostrano pleomorfismo e inizialmente appaiono piccole e puntiformi, crescendo successivamente fino a raggiungere 3-4 mm, con margini netti e superfici lucide. Alcune specie di *Legionella*, come *L. pneumophila*, presentano fluorescenza giallo-verde sotto lampada UV, mentre altre, come *L. bozemanii*, mostrano fluorescenza blu-bianca. Le *Legionella* sono batteri dotati di un'elevata tolleranza alle variazioni di acidità, capaci di sopravvivere in un intervallo di pH compreso tra 5,5 e 8,5. La loro adattabilità ambientale è ulteriormente evidenziata dal fatto che sono state isolate da fonti

naturali con valori di pH che variano da 2,7 a 8,3. Sebbene questi batteri siano in grado di resistere per brevi periodi a condizioni di pH estremamente acide, fino a un minimo di 2,0, il loro metabolismo è ottimizzato per operare in un ambiente leggermente acido, con un pH ideale compreso tra 6,85 e 6,95. Questa capacità di tollerare condizioni ambientali avverse è strettamente legata alla loro struttura cellulare. La parete cellulare di Legionella, pur essendo sottile, è estremamente complessa e contiene una proporzione molto elevata di acidi grassi ramificati, che costituiscono fino al 90% del totale degli acidi grassi presenti. Questa composizione insolita, rispetto ad altri batteri Gram-negativi, conferisce alla parete cellulare una straordinaria resilienza chimica e fisica, rappresentando una caratteristica distintiva del genere. In aggiunta, la membrana citoplasmatica delle Legionella è particolarmente ricca di ubiquinoni, molecole lipidiche con lunghe catene isopreniche laterali, il cui numero varia da 9 a 16 unità. Questo profilo specifico degli ubiquinoni, combinato con l'alto contenuto di acidi grassi ramificati, fornisce un importante criterio chemotassonomico per l'identificazione e la classificazione delle diverse specie all'interno del genere. Tali caratteristiche strutturali non solo favoriscono la sopravvivenza delle Legionella in ambienti estremi, ma ne sottolineano anche la loro unicità biologica e tassonomica. Dal punto di vista biochimico, le Legionella presentano peculiarità uniche che le differenziano significativamente da molti altri batteri Gram-negativi. Questi microrganismi non sono in grado di ridurre i nitrati e non utilizzano carboidrati come fonte primaria di energia. Al contrario, il loro metabolismo si basa prevalentemente sull'idrolisi e l'utilizzo di aminoacidi, grazie a specifiche attività enzimatiche come quelle leucina, valina e cisteina aminopeptidasiche. Questi enzimi consentono la metabolizzazione di aminoacidi per il sostentamento energetico e biosintetico, garantendo la sopravvivenza delle Legionella anche in ambienti poveri di nutrienti tradizionali. Una caratteristica distintiva di molte specie di Legionella è la produzione di β -lattamasi, enzimi in grado di inattivare gli antibiotici β -lattamici, come penicilline e cefalosporine. Questa proprietà conferisce loro un'elevata resistenza agli antibiotici comunemente utilizzati per trattare le infezioni batteriche, rendendo la gestione terapeutica della legionellosi una sfida significativa. La capacità di produrre β -lattamasi sottolinea l'importanza di utilizzare regimi terapeutici mirati, come i macrolidi e i fluorochinoloni, nel trattamento delle infezioni causate da questi patogeni. Un altro elemento critico del metabolismo delle Legionella è rappresentato dalla loro attività fosfatase, un enzima che gioca un ruolo centrale nell'omeostasi cellulare. Questa attività enzimatica è efficace in un ampio intervallo di pH, il che consente al batterio di adattarsi a condizioni ambientali variabili, inclusi ambienti con pH estremamente acidi o alcalini. L'attività fosfatase non solo contribuisce alla capacità delle Legionella di sopravvivere in ambienti avversi, ma

supporta anche il loro metabolismo in condizioni che limiterebbero la crescita di altri microrganismi. Queste caratteristiche biochimiche, combinate con la loro capacità di formare biofilm resistenti e di adattarsi a diverse nicchie ecologiche, rendono le Legionella un patogeno altamente adattabile e resiliente. La colorazione di Gram per le Legionella presenta alcune peculiarità tecniche legate alla struttura sottile e complessa della loro parete cellulare. A causa della debole affinità della loro parete per i coloranti tradizionali, è necessario utilizzare contrastanti come la fucsina basica per evidenziarne chiaramente la morfologia cocco-bacillare. Questo approccio consente di superare le difficoltà associate alla scarsa intensità di colorazione, rendendo possibile l'osservazione microscopica. Tuttavia, a causa della loro struttura unica, che contiene alti livelli di acidi grassi ramificati e ubiquinoni, la colorazione di Gram può non essere sempre ottimale per una diagnosi rapida e accurata. Per aumentare sensibilità e specificità diagnostica, vengono utilizzati metodi alternativi. Tra questi, l'impregnazione argentea di Dieterle rappresenta una tecnica consolidata che consente di visualizzare le Legionella con elevata precisione, sfruttando la capacità dell'argento di legarsi ai componenti cellulari. Un altro metodo ampiamente utilizzato è l'impiego di anticorpi marcati con coloranti fluorescenti, che offrono una sensibilità superiore e consentono un'identificazione rapida, specialmente in campioni clinici come aspirati broncoalveolari, tessuti o fluidi pleurici. Questi approcci si sono dimostrati particolarmente utili per la rilevazione di Legionella pneumophila e di altre specie patogene. Per quanto riguarda l'identificazione tassonomica, la tecnica di ibridazione DNA-DNA è considerata il metodo di riferimento per la classificazione delle Legionella a livello di specie. Questa procedura prevede il confronto del DNA del ceppo batterico con quello delle specie note, permettendo di determinare con precisione l'identità genomica. Tuttavia, l'elevata complessità tecnica e i costi associati a questa metodologia limitano il suo utilizzo a laboratori di ricerca altamente specializzati e non ne favoriscono l'adozione su larga scala nei contesti diagnostici routinari. I metodi sierologici rappresentano un'opzione diagnostica comunemente utilizzata nei laboratori di sanità pubblica, sfruttando antisieri specifici prodotti contro le diverse specie e sierogruppi di Legionella. Questi metodi offrono un buon livello di sensibilità e praticità operativa, rendendoli utili per la sorveglianza epidemiologica. Tuttavia, la specificità può essere compromessa da occasionali reazioni crociate con batteri non appartenenti al genere Legionella, limitando la loro accuratezza diagnostica in alcuni contesti. Questo fenomeno sottolinea l'importanza di integrare i risultati sierologici con altre tecniche più precise, come l'ibridazione molecolare o l'uso di anticorpi monoclonali marcati¹⁰¹⁻¹⁰⁵.

1.3.2 Habitat

La Legionella è un batterio ampiamente diffuso negli ambienti acquatici, sia naturali che artificiali, e ha la capacità di sopravvivere in un'ampia varietà di condizioni ambientali. È comunemente associata alla presenza d'acqua, trovandosi in laghi, fiumi, torrenti, fanghi, zone termali e ambienti umidi. Seguendo il percorso dell'acqua, può colonizzare anche ambienti artificiali, come impianti idrici (tubature dell'acqua potabile), centrali di riscaldamento, sistemi di raffreddamento e di umidificazione dell'aria condizionata presenti in ospedali, alberghi, industrie e abitazioni private. All'interno di questi impianti, le superfici esposte al contatto prolungato con l'acqua favoriscono la formazione di biofilm, all'interno dei quali le legionelle trovano un microhabitat ideale per la loro proliferazione. Da queste nicchie ecologiche, il batterio può diffondersi attraverso la rete idrica, contaminando rubinetti, miscelatori e docce. L'apertura di questi dispositivi genera un aerosol contenente goccioline d'acqua infette, che possono essere facilmente inalate e raggiungere le basse vie respiratorie, aumentando così il rischio di infezione. La Legionella dimostra la sua ubiquitarità essendo stata isolata non solo dall'acqua, ma anche da fonti diverse, come le piante delle foreste pluviali, le acque sotterranee e persino l'acqua di mare. In alcuni ambienti acquatici naturali, come le acque sotterranee contaminate da suoli o sottosuoli con temperature inferiori ai 20°C, la presenza del batterio può essere così bassa da risultare difficilmente rilevabile con i metodi colturali tradizionali. Tuttavia, questa stessa acqua può introdurre Legionella nei sistemi di stoccaggio idrico, dove le condizioni chimico-fisiche possono favorirne la proliferazione. L'acqua rimane comunque il principale serbatoio del batterio: studi hanno dimostrato che le Legionelle sono state isolate dalle acque dolci nel 40% dei casi attraverso metodi colturali e in oltre l'80% dei casi tramite PCR¹⁰⁶.

1.3.3 Fattori che influenzano lo sviluppo di Legionella

La temperatura dell'acqua è un fattore cruciale per la sopravvivenza e la moltiplicazione di Legionella spp. Il batterio può essere isolato da diverse fonti acquatiche con temperature comprese tra 30 °C e 70 °C. È stato individuato in fiumi ghiacciati, stagni, sorgenti termali e acque vicine a vulcani. *L. pneumophila* sopravvive e si moltiplica tra 25 °C e 45 °C, con un range ottimale di 32-42 °C. La crescita è più rapida tra 37 °C e 42 °C, mentre a temperature inferiori ai 20 °C il tasso riproduttivo si riduce notevolmente. Uno studio ha dimostrato che la crescita di *L. pneumophila* diminuisce sopra i 44-45 °C e si arresta tra 48,4 °C e 50 °C. Tuttavia, alcuni ceppi producono anidride carbonica fino a 51,6 °C, suggerendo che alcuni enzimi

respiratori rimangono attivi. I sistemi idrici complessi, come le reti idriche calde, i condizionatori d'aria e le vasche termali, operano a temperature favorevoli alla proliferazione di Legionella, contribuendo anche alla sua diffusione tramite aerosol. Alcuni ceppi hanno un tempo di riduzione decimale (D) di 80-124 minuti a 50 °C e di soli 2 minuti a 60 °C; per una completa eliminazione del batterio, è necessario raggiungere i 70 °C. La presenza di Legionella spp. nei serbatoi d'acqua calda evidenzia il ruolo chiave della temperatura nella colonizzazione degli impianti idrici. Per prevenire il rischio di infezione, l'acqua fredda dovrebbe essere conservata e distribuita sotto i 25 °C, idealmente sotto i 20 °C, sebbene alcuni studi abbiano rilevato la possibilità di crescita del batterio anche a temperature inferiori¹⁰⁷.

Oltre alla temperatura, altri fattori favoriscono la proliferazione di Legionella, tra cui acqua stagnante (tubature cieche e serbatoi), sedimenti, incrostazioni calcaree e materiali idraulici come plastica e PVC, che facilitano la formazione di biofilm. La legionellosi è emersa nella seconda metà del XX secolo a seguito di modificazioni ambientali indotte dall'uomo. In natura, la malattia è rara, poiché gli ambienti di acqua dolce non sono stati coinvolti in epidemie. Alcuni focolai sono stati associati a cantieri edili, probabilmente a causa della disincrostazione degli impianti idraulici per variazioni della pressione idrica¹⁰⁸.

La maggior parte dei casi di legionellosi è legata ad ambienti acquatici artificiali, dove l'acqua è più calda rispetto alla temperatura ambiente. L'alterazione termica degli ecosistemi acquatici può modificare l'equilibrio tra protozoi e batteri, favorendo la rapida proliferazione di Legionella e aumentando il rischio di infezione. L'acqua da sola non è sufficiente per consentire la proliferazione di Legionella pneumophila. Studi condotti su acqua distillata sterile e acqua di rubinetto sterile hanno dimostrato che il batterio può sopravvivere per lunghi periodi in questi ambienti, ma non è in grado di moltiplicarsi in assenza di fonti nutritive. Questo suggerisce che la semplice presenza di acqua, anche se priva di contaminanti evidenti, non è di per sé una condizione sufficiente alla crescita di *L. pneumophila*, che necessita di un apporto specifico di nutrienti per svilupparsi. Le sostanze nutritive essenziali possono essere fornite in diversi modi. Una delle principali fonti è rappresentata da altri microrganismi presenti nell'ambiente acquatico, tra cui batteri, protozoi e alghe, che contribuiscono alla disponibilità di composti organici essenziali. Questi elementi nutritivi possono derivare dalla produzione eccessiva di sostanze organiche, dall'escrezione di metaboliti o dal decadimento di microrganismi stessi. Inoltre, la presenza di biofilm su superfici umide favorisce un ecosistema microbico complesso, in cui *L. pneumophila* può trovare le condizioni ideali per la crescita. Diversi studi hanno evidenziato che gli amminoacidi rappresentano i principali nutrienti necessari per la crescita di *L. pneumophila*. In particolare, la presenza di cisteina e ferro è cruciale per il metabolismo del

batterio, facilitandone la replicazione. La loro disponibilità può essere influenzata dalla composizione chimico-fisica dell'acqua e dalla presenza di materia organica in decomposizione. Inoltre, la simbiosi con protozoi, come le amebe, può fornire un ulteriore supporto nutrizionale, permettendo al batterio di replicarsi all'interno di questi ospiti cellulari e di proteggersi da condizioni ambientali avverse. L'interazione tra *L. pneumophila* e il suo ambiente evidenzia come la sua proliferazione dipenda non solo dalla temperatura e dalla qualità dell'acqua, ma anche dalla presenza di altri microrganismi e di sostanze organiche in grado di sostenerne il metabolismo. Questo aspetto è particolarmente rilevante negli impianti idrici artificiali, dove la presenza di biofilm e sedimenti organici può creare un habitat favorevole alla sopravvivenza e alla diffusione del batterio, aumentando così il rischio di contaminazione e infezione. Nell'acqua dolce, la concentrazione di nutrienti è generalmente insufficiente per supportare la crescita di *Legionella pneumophila*. Anche quando presenti, tali nutrienti vengono rapidamente utilizzati da altre specie batteriche, che competono con *Legionella* per le risorse e ne limitano la proliferazione. Tuttavia, la sua distribuzione ubiquitaria è favorita da un'elevata capacità di adattamento a un ampio range di condizioni chimico-fisiche, sebbene la crescita in laboratorio sia difficoltosa a causa delle particolari esigenze nutrizionali del batterio. Uno dei fattori chiave che spiegano questa apparente contraddizione è la capacità di *Legionella* di instaurare rapporti di simbiosi con altri microrganismi presenti negli ecosistemi acquatici. Batteri saprofiti, microalghe, cianobatteri e specie come *Pseudomonas* possono fornire i substrati nutritivi necessari per la crescita di *Legionella*, rendendola così meno dipendente dai livelli di nutrienti disciolti nell'acqua. Inoltre, la proliferazione del batterio è facilitata dalla sua capacità di moltiplicarsi all'interno di protozoi ciliati, come *Tetrahymena*, e amebe, tra cui *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella* e *Vahlkampfia*. Questi microrganismi condividono con *Legionella* lo stesso habitat acquatico e rappresentano non solo un rifugio protettivo, ma anche una fonte diretta di nutrienti. Studi hanno dimostrato che *L. pneumophila* è in grado di moltiplicarsi in 14 specie di amebe e in due specie di protozoi ciliati (*Tetrahymena pyriformis* e *Tetrahymena vorax*), oltre a una specie di muffa. Tuttavia, la crescita del batterio in assenza di protozoi è stata osservata solo in laboratorio, suggerendo che in natura la sua sopravvivenza dipenda fortemente da queste interazioni ecologiche. Il primo a dimostrare il legame tra *L. pneumophila* e amebe fu Rowbotham nel 1980, osservando la capacità replicativa del batterio all'interno di questi ospiti. Successivamente, altri studi hanno confermato che i protozoi non solo forniscono un ambiente favorevole alla proliferazione di *Legionella*, ma la proteggono anche dagli effetti di agenti disinfettanti e biocidi, nonché dai trattamenti di disinfezione termica. La temperatura dell'acqua

gioca un ruolo determinante in queste interazioni. È stato osservato che a 22 °C *L. pneumophila* viene digerita dalle amebe, mentre a 35 °C è in grado di moltiplicarsi al loro interno. Inoltre, la temperatura influenza l'espressione dei flagelli del batterio, fondamentali per la sua patogenicità: il numero di cellule flagellate è maggiore a 30 °C rispetto a 37 °C, suggerendo una regolazione ambientale di questo meccanismo. È stato dimostrato che ceppi di *Legionella* privi di flagelli sono meno efficienti nell'infettare protozoi e macrofagi rispetto ai ceppi wild-type. Le amebe si nutrono di batteri, funghi e alghe, il che normalmente comporterebbe la digestione di *L. pneumophila* una volta fagocitata. Tuttavia, questo batterio possiede meccanismi di resistenza che gli permettono di evitare la degradazione intracellulare, classificandolo tra i batteri resistenti alle amebe (ARB), insieme ad altri patogeni opportunisti come *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*. Una volta ingerita da un protozoo o da una cellula del sistema immunitario umano, *L. pneumophila* impedisce la fusione del fagosoma con il lisosoma, evitando la degradazione. Successivamente, sfrutta i meccanismi cellulari dell'ospite per ottenere nutrienti, sequestrando vescicole provenienti dal reticolo endoplasmatico e mitocondri. Questo permette al batterio di replicarsi in un ambiente protetto fino alla lisi della cellula ospite, rilasciando forme altamente infettive pronte a colonizzare nuove cellule. Non tutte le cellule infettate vengono distrutte: alcune rimangono integre e continuano a contenere legionelle vitali, espellendole progressivamente attraverso vescicole. Questo fenomeno può avere implicazioni significative per la persistenza del batterio negli ambienti idrici artificiali, in particolare negli impianti idrici, dove le condizioni di temperatura e umidità favoriscono la sopravvivenza delle amebe ospiti. Inoltre, è stato ipotizzato che la lunga coesistenza di *L. pneumophila* con i protozoi abbia contribuito alla sua capacità di infettare cellule eucariotiche umane, come macrofagi alveolari, linfociti e monociti. Studi genetici hanno evidenziato che il batterio utilizza gli stessi geni per la replicazione intracellulare sia nei protozoi che nei macrofagi umani, suggerendo un adattamento evolutivo alla vita intracellulare. Oltre ai protozoi, anche la flora batterica acquatica può influenzare lo sviluppo di *Legionella*. Le interazioni con altre specie microbiche possono essere di due tipi¹⁰⁹:

- Favorenti, quando i batteri presenti nell'acqua fungono da nutrimento per i protozoi, favorendo indirettamente la crescita di *Legionella*.
- Limitanti, quando alcune specie batteriche producono sostanze batteriocine-simili (BLS) con effetto inibitorio sulla crescita di *Legionella*.

Uno studio su 72 ceppi di *Pseudomonadaceae* ha rivelato che il 64% di essi produce batteriocine in grado di contrastare *L. pneumophila*. La ricerca su questi composti antagonisti potrebbe rivelarsi utile per il controllo della diffusione di *Legionella* negli ambienti artificiali. In

particolare, *Pseudomonas fluorescens* si è dimostrata la più efficace nel limitare la formazione di biofilm, mentre altre specie come *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* e *Aeromonas hydrophila* hanno un'azione meno marcata. *Acinetobacter lwoffii*, invece, è risultato l'unico batterio in grado di potenziare significativamente la formazione del biofilm, favorendo così l'insediamento di *Legionella*. Queste dinamiche sottolineano l'importanza di comprendere le interazioni ecologiche tra *Legionella* e gli altri microrganismi presenti nell'ambiente acquatico. La capacità del batterio di sfruttare protozoi e biofilm per sopravvivere e proliferare lo rende un patogeno particolarmente difficile da eradicare nei sistemi idrici artificiali. Pertanto, il controllo della legionellosi non può limitarsi alla regolazione della temperatura dell'acqua, ma deve includere strategie mirate alla riduzione della biomassa microbica e alla limitazione della formazione di biofilm negli impianti idrici¹¹⁰⁻¹¹⁷.

1.3.4 Legionellosi

La specie più rappresentativa del genere *Legionella* è *Legionella pneumophila*, poiché è stata la prima a essere isolata e descritta, ed è quella maggiormente coinvolta nei casi di Malattia del Legionario (LD). Tuttavia, il numero di specie, sottospecie e sierogruppi appartenenti a questo genere è in continuo aumento grazie ai progressi nelle tecniche microbiologiche e molecolari di identificazione. Sebbene *L. pneumophila* sia il principale agente eziologico della legionellosi, altre specie di *Legionella* possono causare infezioni, soprattutto nei contesti ospedalieri, dove i pazienti immunocompromessi risultano particolarmente vulnerabili. Questo fenomeno è attribuibile alla capacità di diversi ceppi di colonizzare ambienti acquatici artificiali come impianti idrici e sistemi di ventilazione, aumentando così il rischio di trasmissione attraverso l'inalazione di aerosol contaminati. Attualmente, il genere *Legionella* comprende oltre 50 specie e più di 70 sierogruppi distinti. Tra questi, *L. pneumophila* è la specie con la maggiore diversità antigenica, presentando 16 sierogruppi, mentre altre specie, come *L. bozemanii*, *L. longbeachae*, *L. feeleeii*, *L. hackeliae*, *L. sainthelensi*, *L. spiritensis*, *L. erythra* e *L. quinlivanii*, ne possiedono due ciascuna. Le restanti specie identificate fino ad oggi sono caratterizzate da un unico sierogruppo. Questa diversità antigenica è un fattore chiave nella patogenicità del batterio e nella sua capacità di eludere il sistema immunitario dell'ospite. Il sierogruppo 1 di *L. pneumophila*, responsabile della storica epidemia del 1976 a Philadelphia, è considerato il più virulento ed è associato a circa il 90% di tutti i casi di legionellosi in cui è stato possibile isolare un ceppo batterico. In Europa, il sierogruppo 1 di *L. pneumophila* è responsabile del 70% delle infezioni da *Legionella*, mentre

il 20-30% è attribuibile ad altri sierogruppi di *L. pneumophila* e il restante 5-10% a specie diverse. Questo dimostra che, sebbene la maggior parte dei casi siano causati dal sierogruppo 1, anche altri sierogruppi e specie di *Legionella* possono avere un ruolo epidemiologico significativo, soprattutto nei contesti sanitari dove la vulnerabilità dei pazienti è maggiore e la trasmissione avviene attraverso impianti idrici contaminati. L'analisi delle caratteristiche antigeniche di *L. pneumophila* sierogruppo 1 ha permesso di identificarne diversi sottotipi, utilizzando tecniche sierologiche, fenotipiche e genetiche avanzate. I ceppi più comunemente associati alla Malattia del Legionario condividono lo stesso epitopo antigenico, il che ha portato alla classificazione di alcuni sottotipi distintivi. Tra questi, il "sottotipo di Pontiac" è stato individuato nei ceppi correlati alla febbre di Pontiac, una forma meno grave della legionellosi caratterizzata da sintomi simil-influenzali senza polmonite. Un altro sottotipo, denominato "Tipo 2 di Joly (Mab2)", è stato identificato in alcuni ceppi con specifiche caratteristiche antigeniche, mentre il "sottotipo 3/1 di Dresden (Mab 3/1)" è stato frequentemente isolato nei casi di infezione umana. Questa suddivisione è particolarmente utile per comprendere le dinamiche di trasmissione e per migliorare le strategie di sorveglianza epidemiologica, consentendo di tracciare l'origine delle infezioni e sviluppare interventi mirati alla prevenzione della diffusione del batterio. Uno studio europeo condotto su 1335 casi di Malattia del Legionario ha evidenziato che l'epitopo Mab 3/1 era presente nel 66,8% dei casi, mentre risultava assente nell'11,7%. L'analisi dei casi in cui *L. pneumophila* Mab 3/1 era negativo ha mostrato che il 53,5% proveniva da infezioni nosocomiali, il 27,3% da casi acquisiti in comunità e il 14,2% da infezioni associate a viaggiatori. Questi dati suggeriscono una possibile correlazione tra i diversi sottotipi antigenici e i contesti di esposizione, con alcuni ceppi che sembrano essere più frequentemente associati agli ambienti ospedalieri, mentre altri risultano predominanti nei casi di infezione acquisiti in comunità o nei viaggiatori. L'identificazione e la caratterizzazione molecolare dei sierogruppi e sottotipi di *Legionella pneumophila* sono strumenti fondamentali per il monitoraggio delle epidemie e il controllo della malattia. Il riconoscimento di ceppi specifici permette di individuare possibili fonti di contaminazione, migliorare le strategie di prevenzione e implementare protocolli di sanificazione più efficaci negli impianti idrici e nei sistemi di climatizzazione. La diversità antigenica di *L. pneumophila* dimostra la sua notevole capacità di adattamento agli ambienti artificiali, rendendola una minaccia persistente soprattutto nelle strutture sanitarie, negli alberghi e in tutti quei luoghi dove i sistemi idrici possono fungere da serbatoio per la diffusione del batterio. Per questo motivo, un'adeguata sorveglianza microbiologica e l'applicazione rigorosa di misure di

controllo della qualità dell'acqua sono fondamentali per ridurre il rischio di infezioni e contenere la diffusione della Malattia del Legionario¹¹⁸⁻¹²².

La patogenicità ed ecologia di *Legionella* sono strettamente interconnesse, poiché la capacità del batterio di causare infezioni dipende direttamente dal suo adattamento agli ecosistemi acquatici e dalla sua relazione con altri microrganismi. La patogenesi della Malattia del Legionario è strettamente legata all'abilità di *Legionella* di infettare e replicarsi all'interno delle cellule fagocitarie eucariotiche, tra cui protozoi e cellule del sistema immunitario umano, come monociti, linfociti e macrofagi alveolari. L'ipotesi più accreditata è che i batteri del genere *Legionella*, analogamente ad altri microrganismi intracellulari patogeni, abbiano sviluppato nel tempo una strategia di sopravvivenza basata sul parassitismo intracellulare nei protozoi. Questo meccanismo si sarebbe poi evoluto, permettendo loro di adattarsi all'infezione delle cellule fagocitarie umane. Il legame tra *Legionella* e protozoi non solo fornisce al batterio un ambiente protettivo e una fonte di nutrienti, ma ha anche giocato un ruolo cruciale nell'evoluzione della sua capacità di infettare l'uomo. In particolare, è stato osservato che la crescita intracellulare di *L. pneumophila* nei protozoi avviene attraverso processi sorprendentemente simili a quelli utilizzati dal batterio per infettare le cellule del sistema immunitario umano. Studi molecolari hanno dimostrato che *L. pneumophila* utilizza gli stessi geni per la replicazione intracellulare sia nelle amebe che nei macrofagi umani, suggerendo una forte conservazione evolutiva di questi meccanismi. Quando il batterio viene fagocitato da una cellula ospite, evita la fusione del fagosoma con il lisosoma, impedendo così la degradazione e creando un vacuolo replicativo specializzato che gli consente di proliferare indisturbato. Questo meccanismo è stato osservato sia nei protozoi che nei macrofagi alveolari umani, confermando che la capacità patogena di *Legionella* derivi direttamente dalla sua adattabilità alla vita intracellulare nei microrganismi acquatici. Le similitudini tra l'infezione nei protozoi e nei macrofagi umani evidenziano come *Legionella* sia un batterio altamente specializzato nella colonizzazione di ospiti eucarioti. Nei protozoi, il batterio sfrutta le funzioni cellulari per ottenere nutrienti e protezione, riuscendo a sopravvivere anche in condizioni ambientali avverse grazie alla capacità delle amebe di formare cisti di resistenza. Questo meccanismo è particolarmente rilevante per la persistenza ambientale di *Legionella*, poiché le cisti amebiche possono proteggere il batterio dai trattamenti di disinfezione chimica e termica, rendendo più difficile la sua eradicazione dagli impianti idrici artificiali. L'adattamento alla vita intracellulare ha fornito a *Legionella* una strategia di sopravvivenza efficace non solo nell'ambiente, ma anche all'interno dell'organismo umano. Una volta inalato attraverso aerosol contaminati, il batterio viene riconosciuto dai macrofagi alveolari come un agente estraneo e fagocitato. Tuttavia, invece di essere distrutto, riesce a

manipolare il metabolismo della cellula ospite per replicarsi e diffondersi. Questo spiega perché le infezioni da Legionella si manifestano prevalentemente sotto forma di polmonite atipica, con una risposta infiammatoria intensa dovuta alla massiccia attivazione del sistema immunitario. Questa relazione tra Legionella e le cellule ospiti ha importanti implicazioni per la comprensione della patogenesi della legionellosi e per lo sviluppo di strategie di controllo e prevenzione. Il fatto che *L. pneumophila* sia in grado di sopravvivere nei protozoi e, contemporaneamente, infettare l'uomo, suggerisce che il controllo del batterio negli ambienti idrici debba tenere conto non solo della presenza di Legionella, ma anche della sua interazione con altri microrganismi. Il monitoraggio delle popolazioni di protozoi negli impianti idrici potrebbe rappresentare una strategia utile per prevenire la proliferazione del batterio e ridurre il rischio di infezione. L'evoluzione di Legionella come patogeno umano è quindi il risultato di un lungo processo di adattamento agli ecosistemi acquatici, in cui la convivenza con protozoi ha favorito lo sviluppo di meccanismi di evasione immunitaria che oggi le permettono di infettare anche le cellule umane. La ricerca continua su questi meccanismi potrebbe fornire nuove soluzioni per il trattamento e la prevenzione della legionellosi, contribuendo a ridurre l'incidenza di questa malattia nelle popolazioni a rischio. Sebbene i meccanismi che regolano la virulenza nei ceppi di Legionella pneumophila non siano ancora del tutto chiariti, l'analisi dei processi infettivi nei protozoi e nell'uomo ha permesso di individuare alcuni fattori chiave che contribuiscono alla sua patogenicità. Tra questi, un ruolo cruciale è svolto dall'espressione di proteine multiple durante l'infezione dei macrofagi, dalla presenza di plasmidi che influenzano la sopravvivenza intracellulare del batterio e dall'espressione di proteasi, che contribuiscono alla degradazione delle strutture cellulari dell'ospite. Approfonditi studi hanno portato all'identificazione di due principali famiglie di geni di virulenza, che conferiscono a Legionella la capacità di crescere all'interno delle cellule ospiti. Un gruppo di questi geni codifica fattori di instaurazione, coinvolti nella modulazione del traffico intracellulare del fagosoma, permettendo al batterio di evitare la fusione con il lisosoma e quindi la degradazione. Il secondo gruppo codifica fattori di mantenimento, necessari per la replicazione batterica una volta che il batterio è stabilmente insediato all'interno della cellula ospite. Questo sofisticato meccanismo di evasione permette a Legionella di proliferare indisturbata all'interno dei macrofagi umani e dei protozoi, garantendone la sopravvivenza sia nell'ospite umano che nell'ambiente. Un fattore strettamente associato alla virulenza di *L. pneumophila* è la proteina Mip (Macrophage Infectivity Potentiator), una proteina di 24 kDa esposta sulla superficie batterica e codificata dal gene *mip*. Studi hanno dimostrato che questa proteina facilita la penetrazione del batterio all'interno delle cellule fagocitarie umane e dei protozoi. Esperimenti

condotti su ceppi mutanti privi della proteina Mip hanno evidenziato una riduzione significativa della capacità di adesione e invasione rispetto ai ceppi wild-type, confermando il ruolo essenziale di questo gene nella fase iniziale dell'infezione. Tuttavia, nonostante la ridotta capacità di infezione, i ceppi mutanti mantenevano la capacità di replicarsi all'interno della cellula ospite, suggerendo che la proteina Mip sia fondamentale per l'adesione e l'ingresso, ma non direttamente coinvolta nella proliferazione intracellulare. Sebbene il meccanismo d'azione di questa proteina non sia ancora completamente compreso, è noto che sia necessaria sia per l'infezione dei macrofagi umani che dei protozoi, evidenziando un'evoluzione del batterio volta a sfruttare più ospiti per garantirne la sopravvivenza. Altri fattori essenziali per l'infezione della cellula ospite sono codificati nei loci genetici associati al sistema di secrezione di tipo IV, un meccanismo di coniugazione batterica utilizzato per il trasporto e l'iniezione di tossine o altre molecole all'interno delle cellule bersaglio. Questo sistema è regolato da un complesso di 24 geni, localizzati in due regioni distinte del cromosoma di *L. pneumophila*, ed è stato denominato Dot/Icm. Il nome deriva dall'acronimo di "Defective Organelle Trafficking" (Dot), che indica il deficit nel movimento degli organuli citoplasmatici, e "Intracellular Multiplication" (Icm), che si riferisce alla moltiplicazione intracellulare del batterio. Questo sistema di secrezione è essenziale per il trasporto di proteine effettrici all'interno della cellula ospite, inibendo la fusione fagosoma-lisosoma e consentendo la creazione di un vacuolo replicativo protetto. Si ipotizza che, una volta stabilito il sito di replicazione, il sistema Dot/Icm venga parzialmente disattivato, suggerendo un controllo fine del meccanismo da parte del batterio per ottimizzare la fase di proliferazione. Un elemento chiave associato a questo sistema di secrezione è la proteina DotA, un substrato secreto dal sistema Dot/Icm che è stato identificato come uno dei principali responsabili della deviazione del fagosoma dalla normale via dell'endocitosi. Il sistema Dot/Icm non è solo cruciale per la colonizzazione intracellulare, ma è anche coinvolto nell'attivazione del trasferimento del DNA plasmidico, suggerendo che possa contribuire alla diffusione di geni di virulenza tra diversi ceppi di *Legionella*. Altri geni fondamentali per la crescita intracellulare includono pilE, che codifica la proteina pilina, coinvolta nell'adesione del batterio alla cellula ospite; pilD, che codifica la peptidasi prepilina, necessaria per la maturazione dei pili batterici; mak (macrophage killing), un gene coinvolto nella distruzione dei macrofagi; mil (macrophage infectivity loci), specifico per l'infettività nei macrofagi; e pmi, essenziale per l'infettività sia nei protozoi che nei macrofagi. La perdita di uno qualsiasi di questi geni compromette significativamente la capacità di *L. pneumophila* di crescere all'interno delle cellule ospiti, dimostrando il ruolo essenziale di questi fattori nella patogenesi del batterio. Un altro aspetto fondamentale della virulenza di *Legionella* è rappresentato

dall'espressione di proteasi, che contribuiscono alla degradazione della matrice extracellulare e alla distruzione delle cellule ospiti. Tra queste, una delle più studiate è la proteasi tessuto-distruttiva, che facilita la disseminazione del batterio all'interno dell'organismo infetto. Oltre alle proteasi, sono stati identificati altri fattori che aumentano il potenziale patogeno del batterio, tra cui citotossine, proteine di shock termico, fosfolipasi, composti coinvolti nell'uptake del ferro e metalloproteasi. Il ferro, in particolare, gioca un ruolo essenziale nella crescita di *Legionella*, e il batterio ha sviluppato sistemi specifici per l'acquisizione di questo elemento, che gli permettono di proliferare anche in ambienti poveri di nutrienti. Tutti questi elementi evidenziano come la virulenza di *L. pneumophila* sia il risultato di un complesso network di fattori genetici e biochimici che permettono al batterio di sopravvivere, infettare e replicarsi in ambienti diversi. La capacità di adattarsi sia agli ecosistemi naturali che agli ospiti umani rende *Legionella* un patogeno altamente versatile, difficile da eliminare e capace di persistere in sistemi idrici artificiali non adeguatamente controllati. L'approfondimento della conoscenza di questi meccanismi potrebbe fornire nuovi strumenti per sviluppare strategie di prevenzione più efficaci, non solo per limitare la diffusione del batterio negli impianti idrici, ma anche per individuare nuovi bersagli terapeutici per il trattamento della legionellosi¹²³⁻¹²⁸.

La prima linea di difesa contro *Legionella pneumophila* è rappresentata dalla barriera aspecifica delle vie respiratorie, costituita dal muco e dall'epitelio ciliato, che svolge un ruolo essenziale nel catturare e rimuovere particelle inalate, inclusi i microrganismi patogeni. Tuttavia, *Legionella* è dotata di pili e altri fattori di adesione che le permettono di attaccarsi alle cellule epiteliali delle vie respiratorie, superando parzialmente questa barriera protettiva. Tutte le condizioni che compromettono l'integrità della barriera muco-ciliare, come il fumo di sigaretta, l'esposizione a inquinanti atmosferici, le patologie polmonari croniche (ad esempio BPCO e fibrosi polmonare) e l'abuso di alcol, aumentano il rischio di infezione, facilitando la colonizzazione batterica e la successiva progressione dell'infezione verso le basse vie respiratorie. Una volta superata la barriera epiteliale, la risposta immunitaria dell'ospite contro *Legionella* si basa prevalentemente su meccanismi di immunità cellulo-mediata, che coinvolgono i macrofagi alveolari, le cellule dendritiche e i linfociti T. Dopo l'inalazione, il batterio viene riconosciuto dai recettori di riconoscimento del patogeno (PRRs) presenti sulle cellule immunitarie innate, tra cui i recettori Toll-like (TLRs) e i recettori Nod-like (NLRs), che attivano una cascata di segnali immunitari finalizzati alla fagocitosi e alla distruzione del patogeno. Tuttavia, *Legionella* ha sviluppato strategie per sopravvivere all'interno dei macrofagi, evitando la fusione fagosoma-lisosoma e creando un compartimento replicativo intracellulare protetto. Alcuni studi hanno identificato almeno due proteine prodotte da *L.*

pneumophila che possono indurre una risposta immunitaria protettiva senza essere direttamente coinvolte nella virulenza. La principale proteina secretoria (MSP, 39 kDa) e le principali proteine della membrana esterna (Omps, 28 kDa) sembrano stimolare una risposta di tipo Th1, favorendo l'attivazione dei linfociti T e potenziando la capacità dei macrofagi di eliminare il batterio. Tuttavia, nonostante l'attivazione del sistema immunitario, l'infezione può progredire rapidamente se il batterio riesce a replicarsi all'interno delle cellule ospiti. La risposta infiammatoria che ne consegue è mediata da citochine pro-infiammatorie, come TNF- α , IL-1 β e IL-6, che reclutano ulteriori cellule immunitarie nell'area infetta. Questa intensa risposta infiammatoria porta alla distruzione degli spazi alveolari, compromettendo la funzionalità polmonare e causando sintomi gravi, tra cui febbre alta, dispnea, tosse produttiva e insufficienza respiratoria nei casi più severi. L'azione dei macrofagi non si limita al polmone: in alcuni casi, questi possono fungere da vettori di disseminazione del batterio a organi extrapolmonari, come il fegato, la milza e il sistema nervoso centrale, aggravando la sintomatologia e aumentando il rischio di complicanze sistemiche. Durante l'infezione da *L. pneumophila*, l'ospite sviluppa una risposta anticorpale umorale, ma questa sembra avere un ruolo limitato nella protezione contro il patogeno. Sebbene si formino anticorpi circolanti, essi non risultano particolarmente efficaci nel neutralizzare il batterio, probabilmente a causa della sua localizzazione intracellulare. Inoltre, i livelli di anticorpi aumentano solo lentamente e, nel 30% dei pazienti, non sono rilevabili mediante immunofluorescenza fino a quattro settimane dopo l'infezione. Questo ritardo nella produzione di anticorpi riduce l'efficacia della risposta immunitaria umorale nella fase acuta della malattia, rendendo l'organismo maggiormente dipendente dai meccanismi di immunità cellulo-mediata per il controllo dell'infezione. Nonostante il ruolo limitato nella protezione, l'aumento dei titoli anticorpali ha un valore diagnostico e epidemiologico significativo. Il dosaggio degli anticorpi anti-*Legionella* è utilizzato per confermare la diagnosi in pazienti con sospetta Malattia del Legionario e per studiare la diffusione dell'infezione nella popolazione. Tuttavia, la diagnosi principale si basa sul rilevamento dell'antigene urinario di *L. pneumophila* sierogruppo 1, che consente di identificare rapidamente l'infezione in fase acuta. Attualmente, non esiste un vaccino contro la legionellosi testato sugli esseri umani. La difficoltà nello sviluppo di un vaccino efficace è dovuta alla complessità della risposta immunitaria contro *Legionella*, alla variabilità antigenica del batterio e alla necessità di stimolare un'immunità cellulo-mediata efficace. Alcuni studi sperimentali hanno testato approcci vaccinali basati su proteine ricombinanti, vettori virali e batteri attenuati, ma finora nessuno di questi ha raggiunto la fase clinica. La ricerca continua a concentrarsi sulla comprensione dei meccanismi di immunità protettiva, con l'obiettivo di

sviluppare strategie preventive efficaci per le popolazioni a rischio, tra cui anziani, immunocompromessi e pazienti ospedalizzati^{129,130}.

La trasmissione all'uomo avviene principalmente attraverso l'inalazione di aerosol contaminati, costituiti da minuscole goccioline d'acqua che possono diffondersi nell'aria e raggiungere le vie respiratorie. Le particelle di diametro inferiore a 5 micrometri sono particolarmente pericolose, poiché possono penetrare profondamente nei polmoni, aumentando il rischio di infezione. Le fonti più comuni di esposizione includono torri di raffreddamento, sistemi di ventilazione, impianti di condizionamento, fontane decorative, nebulizzatori a ultrasuoni, vasche idromassaggio e bagni termali. Anche l'acqua calda proveniente da rubinetti e docce può rappresentare un rischio se contaminata. In ambito ospedaliero, dispositivi medici che utilizzano acqua, come quelli per la respirazione assistita, possono essere veicoli di trasmissione se non adeguatamente mantenuti¹³¹.

La patogenicità della Legionella è strettamente legata alla concentrazione del batterio nell'aerosol inalato e alla sua capacità di sopravvivere e moltiplicarsi all'interno dei macrofagi, le cellule del sistema immunitario deputate alla fagocitosi. La sopravvivenza del batterio nell'aerosol è influenzata da fattori ambientali come l'umidità, la temperatura e la presenza di nutrienti. Studi hanno evidenziato che ceppi patogeni di Legionella pneumophila sierogruppo 1 possono sopravvivere più a lungo nell'aerosol rispetto a ceppi non patogeni.

È importante sottolineare che, ad oggi, non esistono evidenze di trasmissione interumana della legionellosi; il contagio avviene esclusivamente attraverso l'inalazione di aerosol contaminati. Pertanto, la prevenzione si basa principalmente sulla corretta manutenzione e disinfezione degli impianti idrici e dei sistemi di climatizzazione, al fine di limitare la proliferazione del batterio e ridurre il rischio di esposizione.

1.3.5 Fattori di rischio

Il rischio di sviluppare un'infezione da Legionella pneumophila dipende da molteplici fattori, che comprendono le caratteristiche del batterio, la suscettibilità individuale e le condizioni ambientali. Dal punto di vista microbiologico, la patogenicità di Legionella è influenzata dalla sua concentrazione nell'ambiente, dalla virulenza del ceppo e dalla sua capacità di sopravvivere e moltiplicarsi all'interno dei macrofagi. Nonostante sia difficile stabilire con precisione la dose infettante per l'uomo, si stima che concentrazioni comprese tra 10^2 e 10^4 UFC/L possano provocare un caso d'infezione all'anno, mentre livelli tra 10^4 e 10^6 UFC/L siano associati a casi sporadici. Tuttavia, l'effettivo rischio di infezione non è sempre

direttamente correlato alla concentrazione batterica, poiché *Legionella* non si distribuisce uniformemente negli ambienti idrici. In molti casi, elevate concentrazioni del batterio sono state rilevate in assenza di focolai epidemici, suggerendo che la sua pericolosità dipenda da una combinazione di fattori, tra cui la capacità di aerosolizzazione, la stabilità del batterio nell'aerosol e la suscettibilità dell'ospite. La raccolta di dati sulle dinamiche di popolazione di *Legionella* è complessa, poiché molte sorgenti di infezione vengono studiate solo dopo che sono state sottoposte a interventi di decontaminazione. Ciò rende difficile valutare la reale concentrazione batterica al momento dell'esposizione e comprendere appieno le dinamiche di diffusione del patogeno. Tra i fattori predisponenti individuali, il sesso maschile e l'età avanzata sono stati identificati come elementi di rischio, probabilmente a causa di differenze nella risposta immunitaria e nella presenza di comorbidità. Il fumo di sigaretta, oltre a compromettere la funzione delle ciglia dell'epitelio respiratorio e ridurre l'efficacia della barriera mucociliare, aumenta il rischio di infezione e di esiti clinici più gravi. Anche l'abuso di alcol, noto per il suo effetto immunosoppressore e per la sua capacità di alterare i meccanismi di difesa polmonare, rappresenta un fattore di rischio significativo. Inoltre, la preesistenza di patologie croniche, come broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), diabete mellito, neoplasie e insufficienza renale o epatica, predispone all'infezione. Condizioni di immunodepressione, sia congenite che acquisite, aumentano ulteriormente la vulnerabilità, rendendo particolarmente a rischio i pazienti sottoposti a terapie immunosoppressive (trapianti d'organo, chemioterapia, corticosteroidi ad alte dosi) o affetti da HIV/AIDS¹³²⁻¹³⁶.

Dal punto di vista ambientale, il rischio di esposizione dipende dalla modalità, intensità e durata del contatto con l'aerosol contaminato, oltre che da fattori che favoriscono la sopravvivenza e moltiplicazione del microrganismo negli impianti idrici. La presenza di biofilm all'interno delle tubature e dei serbatoi d'acqua costituisce un habitat favorevole per *Legionella*, proteggendola dagli agenti disinfettanti e favorendone la proliferazione. Impianti di riscaldamento centralizzati con reti estese di condutture, punti di giunzione complessi e rami morti sono più suscettibili alla colonizzazione, così come i sistemi dotati di serbatoi di accumulo, che possono facilitare la stagnazione dell'acqua e la crescita batterica^{99,137-139}.

Ulteriori fattori di rischio sono legati alle caratteristiche strutturali e operative degli impianti idrici, come la presenza di un sistema di ricircolo dell'acqua, fenomeni di usura e corrosione delle tubature dovuti all'età dell'impianto, e variazioni nella pressione idraulica. Questi fenomeni possono verificarsi a seguito di interventi di ristrutturazione o manutenzione e determinare il distacco di biofilm contenenti batteri, aumentando temporaneamente il rischio di contaminazione della rete idrica. Anche le vibrazioni meccaniche e le fluttuazioni di

temperatura possono alterare la stabilità microbica dell'acqua, creando condizioni più favorevoli alla sopravvivenza di Legionella.

In sintesi, il rischio di infezione da Legionella è il risultato di un'interazione complessa tra le caratteristiche biologiche del batterio, le condizioni ambientali e la suscettibilità individuale dell'ospite. La prevenzione dell'infezione richiede un approccio integrato che includa il monitoraggio microbiologico degli impianti idrici, l'adozione di misure di sanificazione mirate, il controllo delle condizioni di temperatura e flusso dell'acqua e l'identificazione precoce dei soggetti a rischio per intervenire tempestivamente in caso di esposizione.

1.3.6 Aspetti clinici

Nel luglio del 1976, durante il congresso annuale dell'American Legion presso il Bellevue-Stratford Hotel di Philadelphia, si verificò un'epidemia di polmonite che colpì 221 partecipanti, causando 34 decessi. Nonostante le approfondite indagini di laboratorio, per mesi l'agente eziologico rimase sconosciuto, alimentando il timore di un attacco bioterroristico o di una nuova malattia infettiva sconosciuta. Solo nel gennaio del 1977, dopo sei mesi di intense ricerche, Joseph McDade e Charles Shepard, ricercatori del Centers for Disease Control and Prevention (CDC), riuscirono a isolare il batterio responsabile, un bacillo Gram-negativo che venne denominato Legionella pneumophila. Il nome della malattia, Malattia del Legionario, deriva dall'associazione con l'evento dell'American Legion. Successivamente, si scoprì che diverse epidemie di polmonite precedentemente inspiegate erano in realtà casi di legionellosi. Un esempio significativo è l'epidemia del 1965 presso il St. Elizabeths Hospital di Washington, D.C., che causò 16 decessi su 78 pazienti infetti e che, dopo analisi retrospettive, fu attribuita a Legionella pneumophila. Analogamente, un'epidemia nel 1967 a Pontiac, Michigan, venne identificata come causata dallo stesso batterio. Questa forma più lieve dell'infezione, caratterizzata da sintomi simil-influenzali senza polmonite, è stata chiamata Febbre di Pontiac e si distingue dalla Malattia del Legionario per la sua rapida risoluzione spontanea. Studi successivi dimostrarono che Legionella era stata isolata già in precedenza, ma senza che ne fosse riconosciuta la pericolosità. Nel 1943, Tatlock isolò un ceppo batterico inoculando in cavie il sangue di un paziente infetto, mentre nel 1959 Bozeman identificò un ceppo denominato HEBA da un soggetto con pitiriasi rosea. Nel 1979, Pasculle e collaboratori isolarono un microrganismo dai polmoni di due pazienti sottoposti a trapianto renale, che manifestavano una polmonite acuta, e lo denominarono "agente della polmonite di Pittsburgh". Successivamente,

analisi genetiche dimostrarono che questi tre ceppi appartenevano alla specie *Legionella micdadei*. Attualmente, il termine legionellosi è utilizzato per descrivere un'infezione batterica causata da *Legionella*, che può manifestarsi in diverse forme cliniche. La Malattia del Legionario è una polmonite atipica grave, che può essere letale se non trattata tempestivamente. La Febbre di Pontiac, invece, è una forma non polmonare che si presenta con sintomi influenzali di breve durata e risoluzione spontanea. In rari casi, *L. pneumophila* può diffondersi al di fuori dell'apparato respiratorio, causando forme extrapolmonari di legionellosi che interessano organi come fegato, reni e sistema nervoso centrale.

La Malattia del Legionario non presenta sintomi specifici che la distinguano nettamente da altre forme di polmonite. Tuttavia, alcuni segni clinici sono più comunemente associati a questa infezione. Dopo un periodo di incubazione variabile da 2 a 10 giorni (in media 5-6 giorni), la malattia si manifesta con sintomi simil-influenzali iniziali, tra cui febbre alta (spesso $>38,5^{\circ}\text{C}$), malessere generale, dolori muscolari, mal di testa e brividi intensi. Nelle 24-48 ore successive, la sintomatologia evolve, con comparsa di tosse secca o produttiva, dolore toracico pleurítico e dispnea. In alcuni pazienti si osservano sintomi gastrointestinali come nausea, vomito, diarrea e dolore addominale, che possono complicare la diagnosi differenziale con altre infezioni. Inoltre, nei casi più gravi, possono manifestarsi alterazioni dello stato mentale, confusione, letargia e, raramente, convulsioni. La gravità della Malattia del Legionario varia in base allo stato di salute del paziente. In persone immunocompetenti, la malattia può avere un decorso più favorevole, con una risposta efficace agli antibiotici. Tuttavia, in soggetti anziani, fumatori, immunodepressi o con patologie croniche, il tasso di complicanze e mortalità aumenta considerevolmente. Senza un trattamento tempestivo, la mortalità della Malattia del Legionario è stimata tra il 10% e il 15%, ma può raggiungere il 40% nei pazienti immunocompromessi o nei casi di infezione nosocomiale¹⁴⁰⁻¹⁴².

La Febbre di Pontiac ha un periodo di incubazione più breve, solitamente 12-72 ore, e si presenta con febbre improvvisa, mal di testa, dolori muscolari, brividi, affaticamento e, talvolta, tosse e gola arrossata. A differenza della Malattia del Legionario, non causa polmonite e si risolve spontaneamente in 2-5 giorni senza necessità di terapia antibiotica^{143,144}.

La legionellosi è una malattia in costante aumento, sia per il miglioramento delle tecniche diagnostiche sia per l'incremento dell'esposizione a impianti idrici e sistemi di ventilazione contaminati. In Italia, i casi segnalati sono passati da 79 nel 1983 a 2.964 nel 2018, con un'incidenza media di circa 50 casi per milione di abitanti. In Europa, nel 2021, sono stati notificati 10.724 casi di legionellosi, con una mortalità stimata intorno al 10%. La trasmissione della legionellosi avviene esclusivamente attraverso l'inalazione di aerosol contaminati,

prodotti da impianti idrici mal mantenuti, torri di raffreddamento, impianti di condizionamento, fontane decorative, nebulizzatori a ultrasuoni, vasche idromassaggio e dispositivi medici come i respiratori assistiti. Non esistono evidenze di trasmissione interumana, né per la Malattia del Legionario né per la Febbre di Pontiac. La diagnosi della legionellosi si basa su test microbiologici e sierologici. Il metodo più rapido è il test dell'antigene urinario, che rileva l'antigene di *L. pneumophila* sierogruppo 1. Altri metodi comprendono la coltura dell'espettorato, la PCR (reazione a catena della polimerasi) e i test sierologici. Il trattamento si basa su antibiotici efficaci contro i patogeni intracellulari, come i macrolidi (azitromicina, claritromicina) e i fluorochinoloni (levofloxacina, moxifloxacina). Nei casi più gravi, la terapia viene somministrata per via endovenosa e può durare da 10 a 21 giorni. Poiché *Legionella* si diffonde attraverso sistemi idrici contaminati, la prevenzione si basa su una manutenzione adeguata degli impianti idrici e di climatizzazione, l'uso di biocidi e trattamenti termici per limitare la proliferazione batterica, e il monitoraggio periodico della qualità dell'acqua. Queste misure sono fondamentali per ridurre il rischio di esposizione e prevenire nuovi focolai epidemici. L'infezione da *Legionella pneumophila* si sviluppa dopo un periodo di incubazione variabile tra 2 e 10 giorni, anche se studi epidemiologici hanno evidenziato che nel 16% dei casi l'incubazione può superare i 10 giorni, con una media di circa 7 giorni. Durante questa fase iniziale, il paziente può essere asintomatico o presentare sintomi lievi e aspecifici. Segue una fase prodromica, caratterizzata da malessere generale, mialgie, cefalea, brividi e tosse secca. Il quadro clinico evolve rapidamente, con la comparsa di una polmonite grave, febbre molto alta che può raggiungere 40-41°C, prostrazione intensa, dolori toracici pleuritici e, in molti casi, sintomi gastrointestinali come nausea, vomito e diarrea. Questi ultimi sono particolarmente frequenti nella legionellosi rispetto ad altre polmoniti atipiche e possono essere un elemento chiave per la diagnosi differenziale. L'esordio del quadro polmonare è generalmente brusco, con progressione rapida dei sintomi respiratori. All'inizio, la tosse è generalmente lieve e non produttiva, ma può accentuarsi con l'aggravarsi della polmonite, diventando produttiva con espettorato striato di sangue in alcuni casi. Durante l'esame obiettivo del torace, è possibile riscontrare aree di addensamento parenchimale mono o bilaterali, spesso accompagnate da ipofonesi e rantoli crepitanti. Oltre al coinvolgimento polmonare, la legionellosi può presentare una fase di attacco sistemico, caratterizzata da una compromissione generale dell'organismo con possibili manifestazioni extrapolmonari. Tra le complicanze più comuni si osservano disturbi neurologici tra cui alterazioni dello stato mentale, sonnolenza, disorientamento, confusione, delirio, che possono essere dovuti a una disfunzione neurotossica o a iponatremia grave. In alcuni casi rari, si possono verificare encefalopatia o

convulsioni, mentre i segni meningei sono generalmente assenti. Possono inoltre essere presenti sintomi da compromissione gastrointestinale come dolore addominale, nausea, vomito e diarrea si riscontrano nel 25-50% dei pazienti e possono essere associati a epatopatia lieve, con modesti aumenti delle transaminasi, alterazioni renali quali l'insufficienza renale acuta è una possibile complicanza, spesso correlata a disidratazione e ipotensione. Inoltre, Legionella può determinare iponatriemia significativa (sodio sierico <131 mmol/L), che è un parametro utile nella diagnosi. A livello cardiaco sono stati segnalati casi di miocardite e pericardite, sebbene meno comuni rispetto ad altre complicanze. La polmonite da legionella non presenta caratteristiche cliniche specifiche che permettano di distinguerla nettamente da altre forme di polmonite atipica, di origine virale o batterica. Tuttavia, la presenza simultanea di segni polmonari e sintomi extrapolmonari (in particolare alterazioni neurologiche e gastrointestinali) è considerata altamente suggestiva e può orientare la diagnosi presuntiva^{99,145-148}.

La diagnosi clinica di legionellosi si basa sull'associazione di segni e sintomi chiave, ma deve essere confermata attraverso test microbiologici e sierologici specifici. Il ritardo nella diagnosi può avere conseguenze gravi, specialmente nei pazienti fragili, con un tasso di mortalità che può raggiungere il 40% nei casi nosocomiali o in soggetti immunodepressi. Pertanto, una diagnosi tempestiva e un trattamento antibiotico precoce con macrolidi o fluorochinoloni sono fondamentali per migliorare la prognosi^{149,150}.

Il quadro radiologico della Malattia del Legionario (*Legionella pneumophila*) è indistinguibile da quello di altre forme di polmonite batterica o virale, il che rende la diagnosi differenziale complessa basandosi esclusivamente sulle immagini radiografiche. Tuttavia, alcuni pattern possono essere più frequentemente associati alla legionellosi e possono suggerire la necessità di ulteriori test diagnostici¹⁵¹.

Caratteristiche	Legionellosi	Febbre di Pontiac
Periodo di incubazione	2-14 giorni (raramente oltre 20 giorni)	5 ore - 3 giorni (più comune 24-48 ore)
Durata	Settimane	2-5 giorni
Mortalità	5-15% nei casi comunitari; fino al 40% nei casi nosocomiali; fino all'80% nei soggetti immunocompromessi	0% (forma autolimitante)
Tasso di attacco	0,1-5% nei casi comunitari; 0,4-14% nei casi nosocomiali	>95%
Modalità di trasmissione	Inalazione di aerosol contaminati da impianti idrici, torri di raffreddamento, condizionatori, dispositivi medici	Inalazione di aerosol contaminati (stessi veicoli della Legionellosi)

Fattori di rischio	Età avanzata, fumo, patologie croniche (BPCO, diabete, insufficienza renale, tumori), immunodepressione, ospedalizzazione	Soggetti sani, esposizione ad aerosol contaminati in ambienti chiusi
Sintomi principali	Febbre alta, tosse secca o produttiva, difficoltà respiratorie, dolore toracico, brividi, mialgie, diarrea (25-50%), vomito, nausea, alterazioni dello stato mentale (confusione, delirio), insufficienza renale, iponatremia	Malattia simil-influenzale: febbre alta, brividi, mal di testa, dolori muscolari e articolari, diarrea, vomito, nausea (raro), tosse secca
Complicanze	Insufficienza respiratoria acuta, sepsi, shock settico, disfunzione multiorgano, danno renale, encefalopatia	Nessuna complicanza grave
Diagnosi	Test dell'antigene urinario (per <i>L. pneumophila</i> sg1), coltura su terreni selettivi, PCR, sierologia, esame colturale dell'espettorato	Diagnosi clinica basata sulla sintomatologia e sull'esposizione; rari test microbiologici
Terapia	Macrolidi (azitromicina, claritromicina) o fluorochinoloni (levofloxacina, moxifloxacina); terapia di supporto per i casi gravi	Nessuna terapia specifica; trattamento sintomatico con antipiretici e analgesici
Prevenzione	Manutenzione e disinfezione periodica degli impianti idrici e di ventilazione, monitoraggio della qualità dell'acqua, controllo delle condizioni di temperatura dell'acqua (evitare 25-45°C)	Stesse misure di prevenzione della Legionellosi, con particolare attenzione agli impianti di climatizzazione

Le alterazioni radiografiche iniziano a diventare visibili a partire dal terzo giorno dall'insorgenza dei sintomi e, nella maggior parte dei casi, si manifestano con opacità alveolari localizzate che iniziano in un lobo polmonare e tendono a progredire verso gli altri lobi, formando aree di consolidazione segmentaria o lobare. In alcuni casi, si osserva una progressione a pattern multilobare, con coinvolgimento bilaterale del parenchima polmonare. Circa il 25-30% dei pazienti sviluppa edema polmonare diffuso, caratterizzato da accumuli di fluido che si distribuiscono nei polmoni e che possono simulare un'insufficienza cardiaca congestizia. Nei pazienti immunocompromessi o sottoposti a terapia corticosteroidica, la radiografia del torace può mostrare aree opache ben definite ai margini polmonari, che possono essere erroneamente interpretate come infarto polmonare. Nei pazienti più fragili, in particolare quelli con grave immunosoppressione, possono svilupparsi complicanze polmonari avanzate, tra cui formazione di ascessi polmonari. In rari casi, questi ascessi possono penetrare lo spazio pleurico, provocando empiema (raccolta di pus nella cavità pleurica) o fistole broncopleurali, ovvero aperture anomale tra i bronchi e il rivestimento pleurico, che possono determinare perdita d'aria persistente e pneumotorace. Anche con una terapia antibiotica adeguata, alcuni pazienti possono sviluppare cavitazioni polmonari, ossia necrosi del tessuto polmonare con

formazione di spazi vuoti all'interno del parenchima, fino a 14 giorni dopo l'esordio della malattia. Un altro elemento riscontrato in circa un terzo dei pazienti con legionellosi è la presenza di versamento pleurico, che può essere monolaterale o bilaterale e talvolta si manifesta prima della comparsa delle aree di consolidazione polmonare. Il versamento pleurico è generalmente di modesta entità, ma nei casi più avanzati può diventare più voluminoso, causando compromissione della funzione respiratoria. Nonostante un trattamento antibiotico adeguato, in circa il 30% dei pazienti si osserva una progressione radiologica dell'accumulo di fluido e delle opacità polmonari anche dopo l'inizio della terapia, senza che questo sia necessariamente indicativo di una progressione clinica della malattia. Questo fenomeno è probabilmente dovuto alla persistenza della risposta infiammatoria polmonare e alla lenta risoluzione del danno tissutale causato dall'infezione. La tomografia computerizzata (TC) del torace può essere utile nei casi in cui la diagnosi sia incerta o nei pazienti con sintomi gravi, mostrando con maggiore dettaglio la presenza di cavitazioni, ascessi, versamenti pleurici e consolidazioni polmonari bilaterali. Tuttavia, la conferma diagnostica della legionellosi richiede sempre test microbiologici, poiché l'imaging toracico, pur essendo utile per valutare la gravità dell'infezione, non è sufficiente per una diagnosi definitiva. La diffusione dell'infezione rappresenta un segnale di fallimento terapeutico e si accompagna a un peggioramento del quadro clinico, con possibile evoluzione verso insufficienza respiratoria acuta, sepsi e shock settico. In questi casi, il paziente può presentare un progressivo deterioramento della funzione polmonare, con aumento della dispnea, ipossiemia refrattaria e, nei casi più gravi, necessità di ventilazione meccanica. Le anomalie radiografiche possono persistere per un periodo insolitamente lungo, anche dopo un miglioramento clinico significativo. Studi hanno dimostrato che, nonostante una buona risposta alla terapia antibiotica, fino al 60% dei pazienti continua a presentare opacità polmonari residue anche diverse settimane dopo la risoluzione clinica della malattia. Questo fenomeno è legato alla lenta risoluzione dell'infiammazione polmonare e al rimodellamento del parenchima colpito dall'infezione. Nei casi più gravi, la progressione dell'infezione può portare al decesso entro circa 7 giorni dall'esordio della malattia, soprattutto nei pazienti anziani, immunodepressi o con comorbilità preesistenti. Il rischio di mortalità aumenta significativamente nei pazienti con coinvolgimento multilobare, insufficienza d'organo e ritardo nell'inizio della terapia antibiotica appropriata. Se, invece, l'evoluzione della malattia è benigna, il decorso prevede un miglioramento progressivo con defervescenza della febbre per lisi intorno all'undicesimo giorno. A seguire, anche le immagini radiografiche iniziano a normalizzarsi, sebbene la completa risoluzione possa richiedere settimane o mesi nei casi più gravi. I reperti radiografici

giocano un ruolo fondamentale nel monitoraggio della gravità della malattia, in quanto permettono di valutare il grado di coinvolgimento polmonare, l'eventuale progressione della polmonite e la presenza di complicanze come versamento pleurico, ascessi o cavitazioni. Tuttavia, le immagini radiologiche da sole non consentono di distinguere la Malattia del Legionario da altre polmoniti di origine batterica, virale o fungina. Per questo motivo, la diagnosi deve essere sempre confermata con test microbiologici specifici, tra cui il test dell'antigene urinario per *L. pneumophila* sierogruppo 1, la PCR e la coltura su terreni selettivi. Nei pazienti con sintomatologia severa o con riscontro di persistenti anomalie radiografiche, può essere indicata una tomografia computerizzata (TC) toracica, utile per individuare eventuali cavitazioni polmonari, fibrosi residua o versamenti pleurici di maggiore entità. In alcuni casi, una persistenza prolungata di anomalie radiologiche potrebbe suggerire la necessità di indagini più approfondite per escludere coinfezioni opportunistiche o patologie polmonari croniche sottostanti¹⁵²⁻¹⁵⁷.

Aspetto Radiologico	Descrizione	Possibili Diagnosi Differenziali
Opacità alveolari	Aree di consolidazione che iniziano in un lobo e si estendono progressivamente	Polmoniti batteriche (<i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>)
Pattern multilobare	Coinvolgimento di più lobi polmonari, talvolta bilaterale	Polmonite virale (Influenza, COVID-19, RSV)
Edema polmonare diffuso	Accumulo di fluido nei polmoni, riscontrato nel 25-30% dei pazienti, può mimare edema cardiogeno	Edema polmonare cardiogeno, polmonite interstiziale
Consolidazioni segmentarie o lobari	Addensamenti polmonari tipici della polmonite, spesso indistinguibili da altre cause batteriche	Tubercolosi polmonare, polmoniti fungine (<i>Aspergillo</i> si, <i>Histoplasma</i> si)
Ascessi polmonari	Formazione di raccolte purulente nel parenchima polmonare, più frequente nei pazienti immunodepressi	Polmoniti necrotizzanti da <i>Staphylococcus aureus</i> o <i>Klebsiella</i>
Empiema	Raccolta di pus nella cavità pleurica, suggerisce complicanze avanzate	Empiema parapneumonico, tubercolosi pleurica
Fistole broncopleurali	Apertura anomala tra bronchi e pleura, con possibile pneumotorace o fistola	Trauma polmonare, neoplasie polmonari avanzate
Cavitazioni polmonari	Necrosi del tessuto polmonare con formazione di spazi vuoti fino a 14 giorni dall'esordio	Tubercolosi, infezioni fungine, neoplasie polmonari
Versamento pleurico	Presente in circa un terzo dei pazienti, può essere monolaterale o bilaterale	Polmonite batterica, embolia polmonare con infarto, malattie autoimmuni (LES, AR)
Persistenza delle opacità dopo terapia	Possibile incremento delle aree di addensamento anche dopo inizio terapia antibiotica, non sempre indicativo di progressione clinica	Fibrosi polmonare post-infettiva, infezioni opportunistiche in immunodepressi

Utilità della TC toracica	Permette di identificare cavitazioni, versamenti pleurici e consolidazioni bilaterali con maggiore dettaglio	Indispensabile nei casi dubbi, utile per differenziare infezioni batteriche da processi neoplastici o fibrotici
----------------------------------	--	---

La progressione dell'infezione da *Legionella pneumophila* nonostante il trattamento antibiotico rappresenta un segnale di fallimento terapeutico e si associa a un progressivo peggioramento clinico del paziente. In questi casi, il quadro radiologico può mostrare un coinvolgimento polmonare esteso, con un aumento delle consolidazioni multilobari, versamenti pleurici persistenti e, nei casi più gravi, sviluppo di cavitazioni o ascessi polmonari. Nonostante un miglioramento clinico apparente, è stato osservato che anomalie radiografiche possono persistere per diverse settimane dopo l'inizio della terapia, con un tasso di clearance delle lesioni che può richiedere fino a 60 giorni per il completo riassorbimento. In alcuni pazienti, la persistenza di anomalie polmonari anche dopo il raggiungimento di un miglioramento sintomatico potrebbe suggerire la presenza di danni strutturali residui o di una superinfezione secondaria, condizioni che richiedono un monitoraggio clinico e radiologico prolungato. Nei casi più gravi, soprattutto nei pazienti immunocompromessi, anziani o con comorbilità significative, la malattia può evolvere rapidamente verso insufficienza respiratoria acuta e morte entro 7 giorni dall'esordio dei sintomi. Il rischio di esito fatale è particolarmente elevato nei pazienti che presentano shock settico, insufficienza multiorgano o grave ipossiemia refrattaria nonostante la terapia di supporto. Se, invece, l'evoluzione della malattia è benigna, si osserva un miglioramento progressivo con defervescenza della febbre intorno all'undicesimo giorno. In questa fase, le lesioni polmonari tendono a risolversi gradualmente, anche se in alcuni casi il miglioramento radiologico può essere più lento rispetto alla risoluzione clinica. I reperti radiografici sono strumenti essenziali per la valutazione della gravità della malattia, poiché permettono di monitorare l'estensione del coinvolgimento polmonare e l'eventuale sviluppo di complicanze come versamenti pleurici o cavitazioni. Tuttavia, la diagnostica radiografica da sola non consente di distinguere la Malattia del Legionario da altre polmoniti atipiche, come quelle causate da *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* o infezioni virali come SARS-CoV-2. L'utilizzo della tomografia computerizzata (TC) può essere raccomandato nei pazienti con sintomi persistenti o in caso di mancata risposta alla terapia antibiotica, permettendo una valutazione più dettagliata della presenza di lesioni necrotiche, fibrosi residua o alterazioni strutturali croniche che potrebbero influenzare il decorso clinico¹⁵⁸.

Il trattamento della Malattia del Legionario è complesso e si basa su antibiotici in grado di raggiungere elevate concentrazioni intracellulari, poiché *Legionella pneumophila* è un patogeno intracellulare facoltativo che si replica all'interno dei macrofagi alveolari. La scelta

del farmaco dipende da diversi fattori, tra cui la concentrazione minima inibitoria (MIC) contro *Legionella* spp., la capacità di penetrazione nei tessuti e nelle cellule, l'attività battericida in modelli sperimentali in vitro e in vivo, e l'efficacia clinica dimostrata negli studi su pazienti. Attualmente, le principali classi di antibiotici utilizzate nel trattamento della legionellosi comprendono macrolidi (claritromicina, azitromicina), fluorochinoloni respiratori (levofloxacin, moxifloxacin), tetracicline (doxiciclina) e rifampicina (in combinazione con altri antibiotici in casi gravi). Nei pazienti con legionellosi lieve-moderata, il trattamento antibiotico viene somministrato per 10-14 giorni. Nei pazienti immunocompromessi o con malattia severa, la durata della terapia è estesa a 21 giorni, al fine di ridurre il rischio di recidive o persistenza dell'infezione. Generalmente, i pazienti vengono trattati inizialmente con terapia parenterale (intravenosa) fino a quando non si osserva un miglioramento clinico, per poi passare alla terapia orale. Nei casi più lievi, il trattamento orale sin dall'inizio può essere sufficiente. La defervescenza della febbre avviene di solito entro 3-5 giorni dall'inizio del trattamento, mentre la risoluzione completa della sintomatologia può richiedere diverse settimane. Come per tutti gli antibiotici, anche i farmaci utilizzati nel trattamento della legionellosi possono avere effetti collaterali. I macrolidi possono causare disturbi gastrointestinali (nausea, diarrea) e, in alcuni casi, ototossicità se somministrati ad alte dosi. I fluorochinoloni possono indurre effetti neurologici (vertigini, insonnia, cefalea) e aumentano il rischio di tendiniti e rottura del tendine d'Achille. Inoltre, il prolungamento dell'intervallo QT sull'elettrocardiogramma (ECG) rappresenta una controindicazione nei pazienti con aritmie preesistenti o squilibri elettrolitici. L'eritromicina nei pazienti con cardiopatia, in particolare se somministrata rapidamente per via endovenosa, può determinare prolungamento dell'intervallo QT e aritmie ventricolari pericolose (torsione di punta). Le tetracicline possono causare fotosensibilità e non sono raccomandate nei pazienti pediatrici per il rischio di alterazioni dello sviluppo osseo. Nei pazienti con gravi patologie cardiache, insufficienza renale o epatica, la scelta dell'antibiotico deve essere attentamente valutata per evitare effetti avversi potenzialmente gravi ^{115,159-163}.

Classe di antibiotici	Gruppo di pazienti trattati
Fluorochinoloni (levofloxacin, moxifloxacin)	Pazienti immunodepressi, trapiantati
Rifampicina + eritromicina/claritromicina	Pazienti con forme gravi
Fluorochinoloni respiratori	Pazienti con infezione severa e rischio di complicanze
Imipenem, clindamicina, TMP-SMX	Alternativa in casi resistenti o nei pazienti allergici

Macrolidi (azitromicina, claritromicina)	Prima scelta per la polmonite da Legionella
Beta-lattamici	Inefficaci per Legionella, usati in combinazione con macrolidi per coprire <i>S. pneumoniae</i>
Eritromicina	Possibile impiego nelle forme extrapolmonari

1.3.7 Sindrome extra-polmonare

Da studi autoptici e da recenti indagini cliniche, è stato dimostrato che *Legionella pneumophila* può diffondersi dal sistema respiratorio ad altri distretti del corpo, determinando sindromi extrapolmonari con manifestazioni gravi e spesso difficili da diagnosticare. La diffusione ematogena di *Legionella* può coinvolgere organi vitali come la milza, il fegato, il rene, il miocardio, le ossa e il midollo osseo, le articolazioni, i linfonodi inguinali e intratoracici, nonché il tratto gastrointestinale. Recentemente, sono stati riportati casi di infezioni del sistema nervoso centrale, che includono meningite, encefalite e mielite, spesso con esiti severi nei pazienti immunocompromessi. Le infezioni extrapolmonari da *Legionella* possono essere particolarmente insidiose e si verificano con maggiore frequenza nei pazienti con immunodeficienza primaria o secondaria, trapiantati d'organo, pazienti sottoposti a terapie immunosoppressive e nei soggetti con comorbilità significative. Le manifestazioni più comuni includono miocardite, pericardite, endocardite, sinusite, ascessi cutanei, pielonefrite, pancreatite e peritonite. In particolare, il cuore è uno degli organi più frequentemente colpiti, con casi documentati di sindrome post-cardiotomica, miocardite e endocardite su valvole protesiche, che possono presentarsi con sintomi come febbre persistente, sudorazione notturna, perdita di peso, malessere e insufficienza cardiaca congestizia. Casi di endocardite infettiva causata da *Legionella* spp. sono rari, ma generalmente associati alla presenza di protesi valvolari. I pazienti con endocardite da *Legionella* mostrano una sintomatologia spesso subdola, caratterizzata da febbre di basso grado, astenia, perdita di peso e sudorazione profusa. Studi recenti suggeriscono che l'infezione endocarditica possa essere sottostimata a causa della difficoltà di isolamento del patogeno nei campioni ematici. Un altro distretto frequentemente coinvolto è il sistema nervoso centrale (SNC), con manifestazioni neurologiche che possono includere encefalomyelite, coinvolgimento cerebellare, neuropatia periferica e meningoencefaliti, che nei casi più gravi possono mimare le encefaliti da Herpes virus. Studi recenti hanno evidenziato che l'infezione cerebrale da *Legionella* può essere sottodiagnosticata a causa della mancanza di sintomi specifici e della difficoltà di isolamento del batterio dal liquido cerebrospinale. L'analisi dei casi documentati ha permesso di identificare diversi siti di

infezione extrapolmonare, con una particolare incidenza su alcuni distretti anatomici. Nella tabella precedente sono stati riportati esempi di casi confermati di infezione extrapolmonare da Legionella, includendo informazioni aggiornate sull'età dei pazienti, i siti di infezione e le possibili modalità di trasmissione. Si evidenzia come alcune forme, come le infezioni del seno mascellare e gli ascessi cerebrali, siano state raramente documentate, mentre altre, come l'endocardite e l'infezione di ferite chirurgiche, abbiano un'incidenza maggiore, soprattutto nei contesti ospedalieri. La modalità di trasmissione di queste infezioni extrapolmonari è spesso sconosciuta, ma si ipotizza che possa avvenire per via ematogena, per contatto con acqua contaminata o per derivazione polmonare nel caso di localizzazioni secondarie. Particolare attenzione deve essere riservata ai pazienti che hanno subito interventi chirurgici recenti, specialmente con l'impianto di protesi, poiché il biofilm formatosi sulle superfici protesiche può favorire la colonizzazione batterica e la persistenza dell'infezione. Le infezioni extrapolmonari da Legionella rappresentano una sfida diagnostica importante. La diagnosi di tali infezioni richiede un approccio combinato che includa test microbiologici avanzati, tra cui PCR su liquidi biologici, coltura su terreni selettivi e il test dell'antigene urinario, sebbene quest'ultimo sia meno efficace per la rilevazione di specie diverse da *L. pneumophila* sierogruppo 1. Il trattamento delle forme extrapolmonari si basa su antibiotici con elevata penetrazione tissutale, tra cui fluorochinoloni (levofloxacina, moxifloxacina) e macrolidi (azitromicina, claritromicina), spesso in combinazione con rifampicina nei casi più gravi o refrattari. La durata del trattamento è generalmente prolungata, specialmente nei pazienti con endocardite o infezioni osteoarticolari, per i quali la terapia antibiotica può estendersi fino a 6 settimane. La prevenzione delle infezioni extrapolmonari da Legionella richiede una gestione attenta degli impianti idrici e degli ambienti ospedalieri, con misure di disinfezione adeguate e monitoraggio microbiologico regolare. Le linee guida internazionali raccomandano l'implementazione di sistemi di trattamento dell'acqua, la manutenzione regolare degli impianti di ventilazione e climatizzazione e l'adozione di protocolli di sorveglianza attiva nei pazienti a rischio (WHO, 2021)¹⁶⁴⁻¹⁶⁶.

1.3.8 Epidemiologia

Dal gennaio 2003, la definizione di caso di legionellosi è stata unificata a livello internazionale per garantire una standardizzazione diagnostica tra i diversi sistemi di sorveglianza. Il Sistema Internazionale di Sorveglianza della Legionellosi ha stabilito parametri

comuni per la classificazione dei casi di infezione da Legionella, suddividendo i casi in accertati, probabili e possibili in base a criteri clinici, epidemiologici e microbiologici^{65,167}.

I casi possono essere così distinti:

- Caso accertato: si tratta di un paziente con un'infezione acuta delle basse vie respiratorie, con manifestazioni cliniche di polmonite e segni radiologici di interessamento polmonare confermato da almeno uno dei seguenti accertamenti di laboratorio:
 - Isolamento culturale di Legionella da secrezioni respiratorie, tessuto polmonare o liquido pleurico;
 - Individuazione diretta del patogeno tramite immunofluorescenza diretta (IFD);
 - Rilevazione dell'antigene urinario specifico per Legionella pneumophila sierogruppo 1;
 - Sieroconversione, ovvero un aumento di almeno quattro volte del titolo anticorpale specifico tra due campioni sierici prelevati a distanza di almeno 10 giorni (WHO, 2023).
- Caso probabile: si parla di caso probabile quando il paziente presenta un'infezione acuta delle basse vie respiratorie con evidenza radiologica di polmonite, associata a uno dei seguenti criteri:
 - Aumento significativo del titolo anticorpale per specie diverse da L. pneumophila sierogruppo 1;
 - Positività all'immunofluorescenza diretta con anticorpi monoclonali o policlonali su materiale patologico;
 - Singolo titolo anticorpale elevato (>1:256) verso L. pneumophila sierogruppo 1.
- Caso possibile: viene considerato possibile un caso in cui il quadro clinico sia indicativo di infezione da Legionella, ma non sia stato confermato microbiologicamente e non rientri nella categoria di caso probabile (ECDC, 2022).

Il riscontro di due o più casi correlabili alla stessa fonte di infezione viene definito cluster o focolaio epidemico. Le definizioni di cluster sono state aggiornate nel 2000: inizialmente, erano considerati due casi correlati alla stessa struttura nell'arco di sei mesi, ma successivamente il periodo è stato esteso a due anni, per garantire un monitoraggio epidemiologico più accurato¹⁶⁸.

La sorveglianza della legionellosi in ambito ospedaliero è particolarmente importante, considerando l'elevata mortalità nei pazienti immunocompromessi. Si distingue tra:

- Caso confermato: il paziente ha contratto l'infezione dopo almeno 10 giorni di ospedalizzazione prima della comparsa dei sintomi e la diagnosi è confermata da analisi microbiologiche.
- Caso possibile: il paziente ha sviluppato sintomi di legionellosi tra 1 e 9 giorni dall'ingresso in ospedale, senza una conferma microbiologica definitiva (CDC, 2023).
- Casi associati ai viaggi, per cui devono essere soddisfatti i seguenti criteri:
 - Evidenza clinica e/o radiologica di polmonite;
 - Diagnosi microbiologica confermata (isolamento colturale, sieroconversione o antigene urinario positivo) o presunta (sierologia o immunofluorescenza diretta);
 - Il paziente deve aver soggiornato almeno una notte lontano dalla residenza abituale nei 10 giorni precedenti l'inizio della sintomatologia.

Questa categoria è particolarmente importante per il Sistema Europeo di Sorveglianza della Legionellosi da Viaggio, che monitora l'incidenza della malattia tra i viaggiatori per prevenire la diffusione internazionale. La continua evoluzione della sorveglianza epidemiologica e l'aggiornamento delle definizioni dei casi sono fondamentali per migliorare la gestione dei focolai e adottare strategie preventive più efficaci, specialmente nelle strutture sanitarie e turistiche ad alto rischio^{167,169}.

1.3.9 Diagnostica

La diagnosi della polmonite, inclusa quella causata da *Legionella* spp., si basa su un approccio multidisciplinare che integra anamnesi approfondita, esame obiettivo, imaging toracico e indagini di laboratorio avanzate. L'identificazione tempestiva della legionellosi è fondamentale per un trattamento mirato e per la prevenzione di potenziali focolai epidemici, soprattutto nei contesti nosocomiali e nelle strutture recettive ad alto rischio. Le infezioni da *Legionella* possono essere distinte in due principali categorie in base alla modalità di acquisizione: le infezioni comunitarie, che si sviluppano in ambienti non ospedalieri e sono già presenti al momento del ricovero del paziente, e le infezioni nosocomiali, che si manifestano nei pazienti ricoverati da almeno 48 ore e non erano presenti né in incubazione né clinicamente manifeste al momento dell'ammissione ospedaliera. Queste infezioni sono di particolare

interesse per la sanità pubblica, poiché spesso coinvolgono pazienti immunocompromessi e possono derivare da contaminazione delle reti idriche ospedaliere o da dispositivi medici inadeguatamente sanificati. L'identificazione della legionellosi si avvale di diverse metodologie diagnostiche, ciascuna con specifiche caratteristiche di sensibilità e specificità. L'uso combinato di più test è raccomandato per migliorare l'accuratezza diagnostica e ottimizzare la gestione clinica del paziente. L'esame colturale è considerato il "gold standard" per la diagnosi di Legionella, consentendo l'isolamento del patogeno da campioni respiratori o ematici su terreni selettivi come il Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) con aggiunta di antibiotici per eliminare la flora batterica contaminante. La sensibilità del metodo è del 70%, con una specificità del 100%, ma i tempi di risposta possono variare tra 7 e 10 giorni, rendendolo meno utile per decisioni terapeutiche immediate. La ricerca dell'antigene urinario si basa su test immunoenzimatici (EIA o ELISA) per rilevare antigeni solubili di Legionella pneumophila sierogruppo 1 nelle urine, con una sensibilità tra il 70% e il 90% e una specificità superiore al 99%. I risultati sono disponibili entro poche ore, rendendolo un metodo diagnostico rapido e non invasivo, sebbene non rilevi altri sierogruppi o specie di Legionella. Le tecniche molecolari, come la PCR e la PCR quantitativa in tempo reale (qPCR), permettono la rilevazione diretta del DNA di Legionella nei campioni respiratori, fornendo risultati in poche ore e identificando diversi sierogruppi e specie, comprese quelle non individuabili tramite il test dell'antigene urinario, sebbene possano rilevare anche DNA batterico non vitale, rendendo necessaria un'interpretazione attenta dei risultati. L'analisi sierologica valuta la presenza di anticorpi contro Legionella nel sangue del paziente e un aumento di almeno quattro volte del titolo anticorpale tra due campioni prelevati a distanza di 10-14 giorni è considerato diagnostico. Tuttavia, questa metodica ha un ruolo limitato nella diagnosi precoce, poiché la risposta anticorpale può manifestarsi solo nelle fasi avanzate della malattia. L'immunofluorescenza diretta (DFA) utilizza anticorpi monoclonali o policlonali marcati con fluoresceina per rilevare antigeni di Legionella nei campioni clinici e, sebbene sia altamente specifica, la sensibilità varia tra il 20% e il 70%, richiedendo esperienza specializzata nell'interpretazione. In Italia, la diagnosi di legionellosi è strutturata su tre livelli gerarchici: i laboratori di base, presenti in ospedali e servizi di sanità pubblica, effettuano test diagnostici di primo livello, tra cui il test dell'antigene urinario e la sierologia; i laboratori regionali di riferimento forniscono supporto tecnico ai laboratori di base, eseguendo colture batteriche e tecniche molecolari avanzate, con dati validati per garantire il confronto con quelli di altri Paesi europei; il Laboratorio Nazionale di Riferimento, situato presso l'Istituto Superiore di Sanità, coordina la sorveglianza e la standardizzazione diagnostica a livello nazionale, collaborando con le autorità sanitarie

internazionali per il monitoraggio della diffusione della legionellosi. Negli ultimi anni, l'adozione di tecnologie molecolari avanzate, come la metagenomica e il sequenziamento di nuova generazione (NGS), ha aperto nuove prospettive nella diagnosi di Legionella, permettendo una caratterizzazione più dettagliata delle varianti genetiche e una maggiore capacità di tracciamento epidemiologico. Inoltre, l'integrazione tra sorveglianza ambientale e clinica è diventata sempre più rilevante nella prevenzione dei focolai, con protocolli che prevedono il monitoraggio regolare delle acque nelle strutture ad alto rischio e l'uso di biosensori per la rilevazione precoce della contaminazione batterica. Le linee guida internazionali raccomandano un approccio diagnostico combinato, che prevede l'uso simultaneo del test dell'antigene urinario, della PCR e della coltura batterica per massimizzare la probabilità di identificare l'infezione¹. La crescente attenzione alla resistenza antimicrobica e alla variazione della virulenza dei ceppi di Legionella ha reso essenziale un aggiornamento continuo delle strategie diagnostiche e terapeutiche. In conclusione, la diagnosi della legionellosi si basa su un complesso sistema di rilevazione che deve essere costantemente aggiornato in base alle nuove conoscenze scientifiche. La sinergia tra diagnostica microbiologica, tecniche molecolari e sorveglianza epidemiologica rappresenta la chiave per un controllo efficace della malattia, soprattutto nei contesti ad alto rischio come ospedali e strutture ricettive.

Metodologia di Analisi	Sensibilità (%)	Specificità (%)	Note Interpretative e Utili
Esame Colturale	70	100	Gold standard diagnostico, permette l'identificazione del sierogruppo; tempi di risposta lunghi (7-10 giorni).
Ricerca Antigene Urinario	70-90	99	Metodo rapido (entro poche ore), utile per screening iniziale, ma limitato a *L. pneumophila* sgl.
PCR (Reazione a Catena della Polimerasi)	90-100	100	Metodo molecolare rapido e altamente sensibile, identifica anche DNA non vitale; utile per casi difficili da diagnosticare.
Sierologia	70-80	>95	Utile per studi epidemiologici, ma non per diagnosi precoce; titoli anticorpali elevati possono persistere nel tempo.
Immunofluorescenza Diretta (DFA)	20-70	Alta ma variabile	Metodo specifico, ma con bassa sensibilità; utile per conferme diagnostiche su campioni di tessuto o secrezioni.

¹ (<https://www.ecdc.europa.eu/en/legionnaires-disease/surveillance-and-disease-data>)

1.3.10 Notifica dei casi e Sorveglianza Sanitaria

La Malattia del Legionario, identificata per la prima volta nel 1976 a Philadelphia, ha manifestato casi antecedenti, come evidenziato da studi retrospettivi. In Italia, il primo focolaio noto risale al 1978, coinvolgendo un gruppo di turisti danesi sul Lago di Garda, con 3 casi confermati e 7 sospetti. Un altro episodio significativo si è verificato nel 1979 in un albergo della provincia di Ravenna, registrando 23 casi e 2 decessi. Negli ultimi anni, il numero di casi di legionellosi in Italia ha mostrato un incremento. Nel 2022, sono stati notificati all'Istituto Superiore di Sanità (ISS) 3.111 casi, con un aumento del 14% rispetto all'anno precedente, tornando ai livelli pre-pandemici. Di questi, il 77% è stato segnalato da sei regioni: Lombardia, Emilia-Romagna, Toscana, Veneto, Lazio e Piemonte. Il restante 23% proviene dalle altre 15 regioni e province autonome. Per quanto riguarda la Sicilia, i dati specifici per il 2022 non sono dettagliati nei rapporti nazionali. Tuttavia, è noto che le regioni del Sud Italia, inclusa la Sicilia, contribuiscono al numero totale di casi, sebbene in misura minore rispetto alle regioni del Nord. Questo potrebbe essere dovuto a una combinazione di fattori, tra cui una minore densità abitativa, diverse condizioni climatiche o una possibile sottodiagnosi. La letalità della legionellosi varia dal 5% al 15%, ma può raggiungere il 70%-80% in individui gravemente immunocompromessi. La mortalità è elevata nei casi comunitari, con un tasso del 20%, e ancora più alta nei casi nosocomiali, fino al 39%, a causa della maggiore vulnerabilità dei pazienti ospedalizzati. Nonostante la sua relativamente bassa incidenza, *Legionella pneumophila* rappresenta la seconda causa di polmonite negli adulti, dopo *Streptococcus pneumoniae*. In Italia, la legionellosi è soggetta a notifica obbligatoria di classe II, come stabilito dal D.M. 15/12/1990. In caso di focolai, la notifica rientra nella classe IV, secondo la nota 400.2/26N/3749 del 31 luglio 1991. Il medico che diagnostica un caso di legionellosi deve comunicarlo entro 48 ore al Servizio di Igiene e Sanità Pubblica (SISP) dell'ASL competente. Quest'ultimo, dopo aver validato la diagnosi, trasmette la segnalazione alla Regione tramite l'apposito modello 15. Successivamente, la Regione invia la notifica al Ministero della Salute, all'ISS e all'ISTAT. I dati relativi ai casi notificati vengono pubblicati annualmente sul Bollettino Epidemiologico Nazionale, con dettagli per regione, provincia, età e sesso. In Sicilia, la sorveglianza della legionellosi è coordinata dalla Commissione Regionale Legionella, istituita per monitorare e gestire i casi sul territorio. Nel 2023, la commissione è stata integrata con nuovi esperti a seguito del pensionamento di alcuni membri, garantendo così la continuità e l'efficacia delle attività di controllo. È fondamentale mantenere alta l'attenzione sulla prevenzione, diagnosi e notifica tempestiva dei casi di legionellosi, sia a livello nazionale che

regionale, per implementare misure di controllo efficaci e ridurre l'incidenza della malattia^{74,170,171}.

In ambito lavorativo, il rischio di esposizione alla Legionella è di particolare rilevanza, soprattutto in ambienti in cui il batterio può proliferare in impianti idrici, torri di raffreddamento, sistemi di climatizzazione e ambienti umidi. La Legionella rappresenta un rischio biologico significativo per i lavoratori che operano in settori come la sanità, l'industria alberghiera, la manutenzione di impianti idraulici e di climatizzazione, nonché in contesti industriali in cui l'uso dell'acqua è parte integrante dei processi produttivi. Per tale ragione, il Testo Unico sulla Salute e Sicurezza nei Luoghi di Lavoro – Decreto Legislativo 9 aprile 2008, n. 81 e successive modifiche e integrazioni (D.Lgs. 81/08) – disciplina in modo dettagliato l'esposizione ad agenti biologici, includendo anche il rischio legato alla Legionella. Il Titolo X del D.Lgs. 81/08 è dedicato alla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti dall'esposizione ad agenti biologici e si suddivide in quattro capi fondamentali:

- Capo I - Disposizioni generali: definisce il concetto di agente biologico e stabilisce le condizioni generali di esposizione e gestione del rischio;
- Capo II - Obblighi del datore di lavoro: stabilisce le misure preventive e protettive da adottare per minimizzare l'esposizione dei lavoratori agli agenti biologici;
- Capo III - Sorveglianza sanitaria: disciplina il monitoraggio sanitario dei lavoratori esposti e le visite mediche periodiche;
- Capo IV - Sanzioni: prevede le penalità in caso di mancata applicazione delle norme previste dal decreto.

Il rischio biologico nei luoghi di lavoro si manifesta quando un agente patogeno, come la Legionella, è presente nel ciclo produttivo o negli impianti tecnologici che utilizzano l'acqua, diventando un potenziale pericolo per i lavoratori. La principale via di trasmissione è rappresentata dall'inalazione di aerosol contaminati, generati da sistemi di climatizzazione, torri evaporative, docce, rubinetti e vasche idromassaggio. In alcuni contesti lavorativi, la Legionella può essere trasmessa anche attraverso particelle di polvere umida contenenti il batterio, aumentando così il rischio di esposizione per gli operatori addetti alla manutenzione e pulizia degli impianti¹⁷²⁻¹⁷⁴.

Il Decreto Legislativo 81/08, all'articolo 267, definisce gli agenti biologici come "qualsiasi microrganismo, anche se geneticamente modificato, coltura cellulare ed endoparassita umano che può causare infezioni, allergie o intossicazioni". L'esposizione a tali

agenti nei luoghi di lavoro può determinare lo sviluppo di una patologia professionale, riconosciuta in ambito medico-legale come malattia correlata all'attività lavorativa.

Gli agenti biologici sono classificati all'articolo 268 del D.Lgs. 81/08 in quattro gruppi, in base alla loro pericolosità per la salute umana e alla loro capacità di diffusione nella comunità:

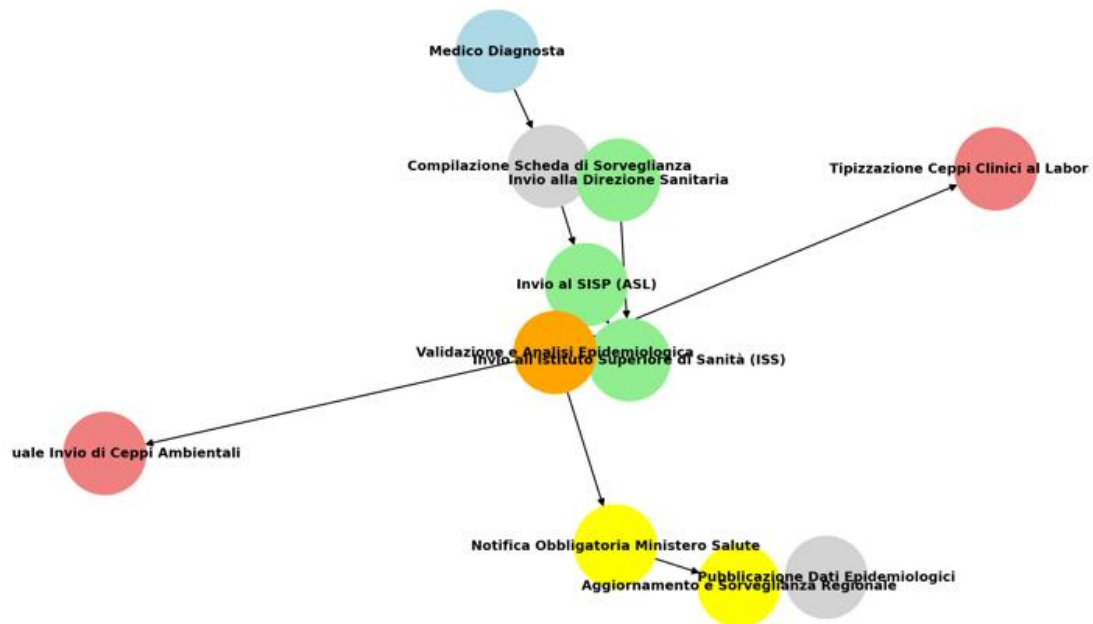
- Gruppo 1: comprende agenti biologici con bassa probabilità di causare malattie negli esseri umani.
- Gruppo 2: comprende agenti che possono causare malattie negli esseri umani e costituire un rischio per i lavoratori, ma con bassa probabilità di propagazione nella comunità e con la presenza di efficaci misure profilattiche e terapeutiche.
- Gruppo 3: comprende agenti biologici che possono causare malattie gravi e rappresentare un serio rischio per i lavoratori. Possono diffondersi nella comunità, ma esistono misure preventive e trattamenti efficaci.
- Gruppo 4: comprende agenti biologici altamente patogeni, con elevato rischio di trasmissione e per i quali non esistono misure profilattiche o terapeutiche efficaci.

La *Legionella pneumophila* è classificata nel Gruppo 2, poiché è un agente patogeno che può provocare infezioni negli esseri umani, in particolare la Malattia del Legionario, ma presenta un rischio limitato di trasmissione interumana e dispone di trattamenti terapeutici efficaci. Tuttavia, in ambienti ad alto rischio, come ospedali e strutture sanitarie, la *Legionella* può rappresentare una minaccia più grave, specialmente per i soggetti immunocompromessi. Per questo motivo, il datore di lavoro è obbligato a valutare il rischio biologico, adottando adeguate misure di prevenzione e protezione, come il monitoraggio periodico degli impianti idrici, la manutenzione delle strutture e l'informazione/formazione dei lavoratori esposti. La sorveglianza sanitaria, come previsto dal Capo III del Titolo X del D.Lgs. 81/08, rappresenta uno strumento essenziale per garantire la tutela della salute dei lavoratori a rischio di esposizione alla *Legionella*. Le Linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi, pubblicate dal Ministero della Salute nel 2015, rappresentano uno strumento fondamentale per il contenimento del rischio legato alla diffusione della *Legionella* in ambienti comunitari e lavorativi. Il documento ha l'obiettivo di fornire indicazioni precise e aggiornate per la prevenzione e il controllo della legionellosi, attraverso un approccio integrato che coinvolge strutture sanitarie, autorità locali, aziende e professionisti del settore. Il documento si suddivide in differenti sezioni, ciascuna dedicata a un aspetto chiave della gestione del rischio. Vengono approfonditi gli aspetti generali della legionellosi, compresi i fattori di rischio e le condizioni

ambientali favorevoli alla proliferazione del batterio. Sono inoltre descritte in dettaglio le modalità di trasmissione, ponendo particolare attenzione ai sistemi idrici e di climatizzazione che rappresentano le principali fonti di diffusione della Legionella. Un'ampia sezione è dedicata alla sintomatologia clinica, con una distinzione tra la Malattia del Legionario, caratterizzata da una grave polmonite, e la Febbre di Pontiac, una forma più lieve della patologia. Le Linee guida offrono anche indicazioni operative per il personale sanitario, i tecnici della prevenzione e i gestori degli impianti, affinché possano implementare misure efficaci per la prevenzione e il controllo della legionellosi. Vengono descritti i metodi di campionamento e analisi microbiologica, con protocolli standardizzati per la ricerca del batterio in diverse tipologie di impianti idrici e di aerodispersione. Sono inoltre fornite specifiche procedure di sanificazione per ridurre la contaminazione e limitare il rischio di infezione. A livello regionale, la Regione Sicilia, con il Decreto del 5 agosto 2015, ha recepito l'Accordo tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano, adottando ufficialmente le Linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi. Questo recepimento ha reso obbligatorio l'adeguamento delle strutture e degli impianti alle prescrizioni contenute nel documento nazionale, introducendo un quadro normativo chiaro per la gestione del rischio legionellosi nel territorio siciliano. In particolare, il decreto regionale prevede l'attuazione di piani di autocontrollo e monitoraggio, la formazione del personale addetto alla gestione degli impianti e l'applicazione di misure di sanificazione specifiche nelle strutture a rischio, come ospedali, case di riposo, hotel, stabilimenti termali e impianti sportivi. La sorveglianza della legionellosi in Italia è regolamentata da un sistema strutturato che garantisce la raccolta tempestiva e accurata dei dati relativi ai casi diagnosticati. Il medico che identifica un caso di legionellosi ha l'obbligo di compilare immediatamente la scheda di sorveglianza (Allegato A) e di inviarla al Servizio di Igiene e Sanità Pubblica (SISP) dell'Azienda Sanitaria Locale (ASL) competente. Questa procedura è fondamentale per attivare rapidamente le misure di controllo e prevenzione necessarie. Parallelamente, la Direzione Sanitaria dell'ospedale in cui è avvenuta la diagnosi deve trasmettere la stessa scheda all'Istituto Superiore di Sanità (ISS). Questo doppio canale di comunicazione assicura una sorveglianza efficace a livello sia locale che nazionale. È importante sottolineare che l'invio della scheda di sorveglianza non esime dall'obbligo di notifica previsto dal Decreto Ministeriale del 15 dicembre 1990, che classifica la legionellosi tra le malattie a notifica obbligatoria. Per quanto riguarda i ceppi clinici isolati, è essenziale inviarli al Laboratorio di Batteriologia e Micologia Medica dell'ISS, designato come Laboratorio Nazionale di Riferimento per la legionellosi, per procedere alla tipizzazione o alla

conferma diagnostica. In situazioni particolari, l'invio di ceppi ambientali deve essere concordato direttamente con l'ISS.

Schema del Processo di Sorveglianza della Legionellosi



La tempestività nell'invio della scheda di sorveglianza all'ISS è cruciale per l'implementazione di misure preventive adeguate. Successivamente, la Regione di competenza invia una scheda aggiornata all'ISS, integrando eventuali informazioni aggiuntive raccolte durante l'indagine epidemiologica. Dal 1983, anno in cui l'ISS ha istituito il Registro Nazionale della Legionellosi, fino al 2022, sono stati notificati un totale di 3.111 casi di legionellosi in Italia, con un incremento del 14% rispetto all'anno precedente. Questo aumento potrebbe riflettere sia una reale crescita dell'incidenza della malattia sia un miglioramento nelle capacità diagnostiche e nella consapevolezza clinica. È importante notare che il 77% dei casi è stato notificato da sei regioni: Lombardia, Emilia-Romagna, Toscana, Veneto, Lazio e Piemonte. Questa concentrazione potrebbe essere attribuita a una maggiore densità abitativa, a una rete diagnostica più efficiente o a una combinazione di entrambi i fattori. Nonostante l'aumento dei casi notificati, si ritiene che la legionellosi sia ancora sottostimata, specialmente nelle regioni meridionali, dove la consapevolezza e le risorse diagnostiche potrebbero essere meno sviluppate. Pertanto, è fondamentale promuovere una formazione continua per i professionisti della salute e implementare protocolli diagnostici standardizzati su tutto il territorio nazionale.

La distribuzione per età dei pazienti mostra che circa il 70% dei casi riguarda individui di età pari o superiore a 60 anni, con un'età media di 67,2 anni. Il 69,5% dei casi riguarda il sesso maschile, con un rapporto maschi/femmine di 2,3:1. Questi dati suggeriscono una maggiore vulnerabilità negli uomini anziani, potenzialmente a causa di fattori di rischio come

patologie croniche o abitudini di vita. Per ogni caso notificato, viene registrata l'occupazione lavorativa del paziente al fine di individuare eventuali attività professionali associate a un rischio più elevato di esposizione alla Legionella. Tuttavia, nel 9% dei casi, questa informazione non è disponibile, indicando la necessità di una raccolta dati più completa e dettagliata.

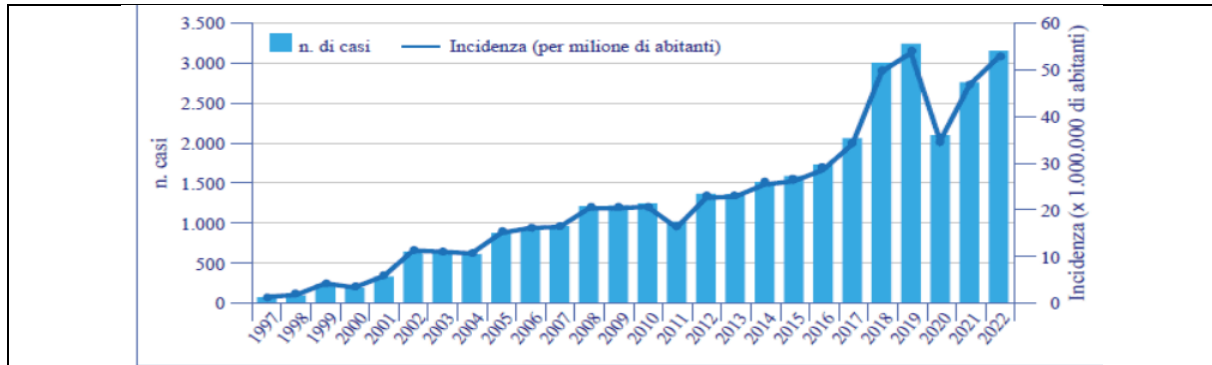


Figura 1 - Numero di casi e incidenza della legionellosi per anno. Italia, 1997-2022

Rota MC, Caporali MG, Giannitelli S, Urciuoli R, Scaturro M, Ricci ML. I risultati del sistema di sorveglianza della legionellosi nel 2021. *Boll Epidemiol Naz* 2023; 4(1):25-32.

Nel 2022, in Italia, sono stati notificati all'Istituto Superiore di Sanità (ISS) un totale di 3.111 casi di legionellosi, registrando un incremento del 14% rispetto all'anno precedente e ritornando ai livelli pre-pandemici. Di questi, 3.039 sono stati classificati come casi confermati e 72 come probabili. L'incidenza nazionale è stata di 51,9 casi per milione di abitanti, con una distribuzione geografica che evidenzia un gradiente Nord-Sud: 78,7 casi per milione al Nord, 55,6 al Centro e 14,4 al Sud. L'età media dei pazienti è risultata di 68 anni, con oltre il 70% dei casi in individui di età pari o superiore a 60 anni. Il 68,1% dei casi ha riguardato uomini, con un rapporto maschi/femmine di 2,2:1².

Per quanto riguarda le esposizioni a rischio nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi, il 17,5% dei soggetti ha riportato una possibile esposizione. Dei 3.111 casi notificati, 90 (2,9%) sono stati classificati come nosocomiali, di cui 46 (51,1%) con origine nosocomiale confermata e 44 (48,9%) probabile. Inoltre, 550 casi sono stati associati a viaggi, comprendendo sia turisti italiani che stranieri, con 335 diagnosticati in Italia e 215 segnalati all'ISS dall'European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet). È importante notare che l'elevato numero di casi registrato evidenzia come la gestione dell'acqua negli edifici, sia pubblici che privati, sia spesso trascurata o inadeguata, e come manchi una formazione adeguata per i gestori o gli amministratori degli edifici e per i tecnici del settore. Nel 2022, si è osservato quasi un

² epicentro.iss.it

raddoppio dei cluster di legionellosi associati a strutture ricettive rispetto all'anno precedente. Questi dati sottolineano l'importanza di una sorveglianza continua e di misure preventive efficaci per controllare la diffusione della legionellosi, specialmente in ambienti ospedalieri e strutture ricettive.

1.3.11 Metodi di prevenzione e bonifica

La scelta della metodologia più appropriata per la bonifica del sistema idrico dipende da molteplici fattori, tra cui le caratteristiche della struttura interessata, la tipologia dell'impianto idrico e le proprietà chimico-fisiche dell'acqua. Strutture sanitarie come ospedali e case di cura presentano problematiche differenti rispetto a stabilimenti termali o strutture alberghiere. La complessità e il materiale delle tubazioni possono interferire con l'azione dei disinfettanti, così come il pH, la temperatura e la torbidità dell'acqua possono influenzare l'efficacia del trattamento. I trattamenti di decontaminazione del sistema idrico rappresentano una misura preventiva essenziale per il controllo della legionellosi, supportata da una progettazione accurata degli impianti e da un monitoraggio costante, specialmente in ambienti ad alto rischio come ospedali, stabilimenti termali e case di riposo. L'adozione di strategie di prevenzione basate sulla riduzione della carica microbica nelle riserve idriche contribuisce a limitare il rischio di contaminazione da *Legionella* spp.. I principali trattamenti indicati dalle linee guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi possono essere suddivisi in fisici e chimici. Tra i trattamenti fisici, il trattamento termico rappresenta una delle tecniche più utilizzate. Il calore inattiva *Legionella* in modo proporzionale al tempo di esposizione, attraverso due principali approcci. Lo shock termico prevede il mantenimento della temperatura dell'acqua tra 60°C e 80°C per tre giorni, con un flusso costante di acqua calda a 60°C in tutte le uscite per almeno 30 minuti al giorno. Il mantenimento continuo della temperatura tra 55-60°C è adottato in molte strutture pubbliche poiché non richiede attrezzature particolari e può essere implementato rapidamente in caso di epidemia. Tuttavia, presenta limitazioni legate alla corrosione delle tubature, al rischio di scottature e all'elevato consumo energetico.

La radiazione ultravioletta (UV) agisce sul DNA batterico, interferendo con la replicazione. La massima efficacia disinfettante si ottiene a 254 nm. Tuttavia, la mancanza di un effetto residuo rende questo metodo insufficiente come unica strategia di controllo. La torbidità dell'acqua e la presenza di biofilm possono inoltre ridurre l'efficacia della radiazione¹⁷⁵.

La filtrazione mediante l'uso di filtri con pori da 0,22 µm applicati ai punti di utilizzo (rubinetti, docce) consente di ottenere acqua esente da Legionella. Questo metodo è particolarmente indicato nei reparti ospedalieri a rischio, ma presenta lo svantaggio dei costi elevati e della necessità di sostituzioni frequenti. Tra i trattamenti chimici, l'uso di ioni metallici, in particolare rame e argento, ha dimostrato efficacia grazie all'azione sulla parete cellulare batterica. Gli ioni sono generati elettroliticamente e la loro concentrazione dipende dall'energia applicata agli elettrodi. Questo metodo ha il vantaggio di non essere influenzato dalla temperatura dell'acqua e garantisce un effetto battericida persistente. Tuttavia, può risultare inadatto per reti idriche in zinco e richiede una costante manutenzione degli elettrodi.

Il perossido di idrogeno combinato con argento rappresenta una soluzione innovativa, grazie alla sua capacità di degradare il biofilm e inattivare i microrganismi. Questo trattamento è considerato una valida alternativa alla clorazione e ai trattamenti termici, anche se necessita di ulteriori studi per valutarne l'efficacia a lungo termine¹⁷⁶.

La clorazione, sia in forma gassosa che tramite ipoclorito di sodio o ipoclorito di calcio, è uno dei metodi più utilizzati per il controllo della qualità microbiologica delle acque potabili. Tuttavia, Legionella è particolarmente resistente alla clorazione, soprattutto quando si trova associata ad amebe. Esistono due approcci principali: l'iperclorazione shock, che consiste nell'immissione di cloro fino a ottenere concentrazioni di cloro residuo libero di 20-50 mg/l in tutto l'impianto per un breve periodo di tempo, e l'iperclorazione continua, che prevede il mantenimento di una concentrazione di cloro residuo tra 1 e 3 mg/l. Lo svantaggio della clorazione è la sua limitata capacità di eradicare il batterio a lungo termine, con un rischio elevato di ricontaminazione.

Il biossido di cloro è un gas utilizzato per la disinfezione dell'acqua potabile, con proprietà battericide superiori rispetto al cloro e una maggiore capacità di riduzione del biofilm. Le clorammine, ottenute dalla reazione del cloro con l'ammonio, offrono una maggiore stabilità e un effetto più duraturo, senza formazione di trihalometani, ma sono ancora in fase sperimentale. L'ozono, con un'azione rapida e un'elevata efficacia contro Legionella, è più potente del cloro, ma non ha potere residuo e non penetra nel biofilm. Il costo elevato e la richiesta di personale specializzato ne limitano l'uso su larga scala. Il bromo è impiegato principalmente per la disinfezione delle piscine e delle torri di raffreddamento, ma non è utilizzato per il trattamento delle acque potabili.

Le Linee Guida nazionali e regionali per la prevenzione e il controllo della legionellosi forniscono precise indicazioni sui metodi di bonifica più adeguati in base allo stato dell'impianto e all'ambiente in cui si interviene. La scelta della metodologia più idonea deve

tenere conto delle caratteristiche specifiche dell'infrastruttura, del livello di contaminazione e delle condizioni operative, assicurando un monitoraggio costante e interventi tempestivi per minimizzare il rischio di diffusione del batterio.

La valutazione e la gestione del rischio legato alla Legionella nei sistemi di distribuzione dell'acqua potabile riveste un'importanza fondamentale in diversi contesti, quali edifici pubblici e privati, strutture ospedaliere, case di cura e alberghi. Per prevenire la proliferazione di questo microrganismo patogeno, è necessario analizzare una serie di fattori di rischio che possono favorire la crescita e la diffusione del batterio. Tra i principali elementi da considerare vi sono la qualità dell'acqua, l'efficacia dei trattamenti di potabilizzazione, le caratteristiche strutturali del sistema idrico, la stagnazione dell'acqua e l'eventuale utilizzo di materiali che favoriscono la formazione di biofilm. Anche la temperatura dell'acqua e la produzione di aerosol rappresentano aspetti cruciali da monitorare, poiché possono facilitare la sopravvivenza e la trasmissione della Legionella. La qualità dell'acqua utilizzata all'interno dei sistemi di distribuzione deve rispettare rigorosi standard di potabilità e non presentare elevate concentrazioni di nutrienti, microrganismi o sedimenti che potrebbero favorire la proliferazione batterica. Sebbene il trattamento delle acque superficiali destinate al consumo umano preveda processi di filtrazione e disinfezione, è stato dimostrato che la clorazione tradizionale, basata su concentrazioni adeguate per l'eliminazione di *Escherichia coli* e altri coliformi, non è sempre efficace contro la Legionella. Questo batterio, infatti, presenta una maggiore resistenza al cloro rispetto ad altri patogeni di origine fecale, rendendo necessaria l'integrazione con trattamenti alternativi. Il sistema di distribuzione dell'acqua potabile può influenzare in modo significativo la proliferazione di Legionella, soprattutto quando si verificano fenomeni di ristagno nei bracci morti, nei serbatoi di accumulo o nei circuiti poco utilizzati. Per limitare questi rischi, è fondamentale adottare soluzioni progettuali che evitino inutili ramificazioni, che prevedano il ricircolo continuo dell'acqua e che garantiscano un'adeguata manutenzione delle valvole e dei punti terminali. Inoltre, è importante considerare la produzione di aerosol, poiché la diffusione del batterio avviene principalmente attraverso la nebulizzazione di particelle d'acqua contaminate. Le strategie di controllo dovrebbero quindi includere una progettazione mirata degli impianti, evitando il più possibile la formazione di microgoccioline aerodisperse. La scelta dei materiali per la costruzione delle reti idriche gioca un ruolo chiave nella prevenzione della Legionella. In passato le tubature erano prevalentemente realizzate in metalli come ferro zincato, ottone e rame, mentre oggi si utilizzano sempre più spesso materiali sintetici, tra cui il cloruro di polivinile e il polibutilene. Tuttavia, è stato osservato che alcuni materiali possono favorire la crescita batterica e la formazione di biofilm, soprattutto se rilasciano composti

organici nell'acqua. La canapa e altri componenti naturali presenti nei giunti e nei tubi flessibili, ad esempio, possono fungere da substrato per la proliferazione microbica. Il rame, sebbene soggetto a fenomeni di corrosione, ha dimostrato di possedere proprietà batteriostatiche che limitano la crescita di Legionella, grazie alla sua capacità di alterare la permeabilità cellulare del microorganismo. La disinfezione chimica dei sistemi di distribuzione rappresenta un'altra misura essenziale per il controllo della Legionella, ma la complessità di alcuni impianti può rendere difficile l'applicazione uniforme dei trattamenti. Inoltre, la presenza del batterio all'interno di biofilm o all'interno di protozoi riduce l'efficacia di molte metodiche convenzionali. Per un controllo efficace, è preferibile utilizzare disinfettanti con un effetto residuo prolungato, in grado di contrastare la proliferazione microbica nel tempo. Recentemente, le clorammine si sono dimostrate più efficaci rispetto al cloro nel mantenere un ambiente ostile alla Legionella, sebbene siano ancora in fase di studio per un utilizzo su larga scala. Il biofilm costituisce un rifugio ideale per Legionella, proteggendola dagli agenti disinfettanti e facilitandone la moltiplicazione. La prevenzione della formazione di biofilm è quindi un obiettivo primario nella gestione del rischio, e può essere ottenuta attraverso una combinazione di strategie che includono la pulizia regolare delle tubature, la riduzione dei nutrienti disponibili nell'acqua e l'impiego di agenti chimici specifici per la disgregazione della matrice biologica. La temperatura dell'acqua rappresenta un altro fattore determinante per la proliferazione della Legionella. Il batterio è in grado di sopravvivere e replicarsi tra i 25 e i 45°C, con un range ottimale compreso tra 32 e 42°C. Al di sotto dei 20°C la crescita è fortemente inibita, mentre temperature superiori ai 60°C portano alla sua inattivazione. Per questo motivo, la gestione della temperatura all'interno dei sistemi idrici è una delle strategie più efficaci per il controllo della Legionella. Nei circuiti di ricircolo dell'acqua calda sanitaria, la temperatura in uscita dal boiler dovrebbe essere mantenuta sempre al di sopra dei 60°C, mentre quella di ritorno non dovrebbe scendere sotto i 50°C. Nei punti di erogazione, l'acqua fredda dovrebbe raggiungere una temperatura inferiore ai 20°C entro due minuti, mentre quella calda dovrebbe superare i 50°C entro un minuto. Le torri di raffreddamento e i condensatori evaporativi rappresentano un altro ambiente critico per la proliferazione della Legionella. Il funzionamento di questi dispositivi prevede il contatto tra l'acqua calda e l'aria atmosferica, con conseguente formazione di aerosol che può contenere il batterio. Per ridurre il rischio di diffusione, è essenziale adottare misure di manutenzione e pulizia regolari, garantire un'adeguata circolazione dell'acqua e implementare trattamenti chimici efficaci. Il biofilm che si forma all'interno delle torri di raffreddamento costituisce una delle principali fonti di contaminazione e deve essere controllato attraverso l'impiego di agenti antimicrobici specifici.

L'uso di detergenti compatibili e di biocidi alternati può migliorare l'efficacia della disinfezione e prevenire la selezione di ceppi resistenti. Infine, un'adeguata progettazione e gestione degli impianti è fondamentale per minimizzare il rischio di contaminazione. Le torri di raffreddamento dovrebbero essere posizionate lontano da prese d'aria, aperture di edifici e aree di accesso pubblico per ridurre la dispersione di aerosol contaminato. La manutenzione regolare e l'implementazione di programmi di monitoraggio microbiologico consentono di rilevare tempestivamente la presenza di Legionella e di intervenire con misure correttive appropriate. L'integrazione di queste strategie con un efficace programma di manutenzione preventiva e un controllo costante della qualità dell'acqua rappresenta l'approccio più efficace per ridurre il rischio di legionellosi e garantire la sicurezza degli ambienti idrici^{80,176-182}.

2. Scopo della tesi

L'obiettivo di questa tesi di dottorato è stato quello di valutare in maniera approfondita la presenza, la proliferazione e la diffusione di *Legionella* spp. in diverse tipologie di acque, sia naturali che artificiali, nel contesto di un ambiente in rapida trasformazione a causa dei cambiamenti climatici. L'incremento delle temperature globali, le alterazioni nei cicli idrici e la crescente domanda di risorse idriche rappresentano fattori determinanti che stanno modificando le dinamiche ecologiche e microbiologiche delle risorse acquatiche, creando condizioni più favorevoli alla sopravvivenza e alla trasmissione di microrganismi patogeni come *Legionella* spp..

Obiettivi specifici dello studio posti sono stati:

1. **Caratterizzazione ambientale e microbiologica:** Analizzare le concentrazioni e la distribuzione di *Legionella* spp. in una varietà di ambienti acquatici, comprendendo acque naturali (laghi, fiumi, sorgenti termali) e acque artificiali (sistemi di distribuzione idrica urbana, piscine, impianti idrici degli edifici, sistemi di condizionamento). L'analisi ha preso in considerazione le caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche di ciascun ambiente, al fine di identificare le condizioni ottimali per la proliferazione del patogeno.
2. **Influenza del cambiamento climatico:** Valutare il ruolo delle variabili climatiche (aumento delle temperature, variazioni della qualità e della quantità delle risorse idriche) nel facilitare la crescita e la persistenza di *Legionella*. Questo è stato indagato in relazione a scenari futuri di cambiamento climatico, con un'attenzione particolare alle implicazioni per le acque destinate a scopi ricreativi, potabili e terapeutici.
3. **Resistenza e sopravvivenza:** Studiare i meccanismi di resistenza di *Legionella* spp. ai trattamenti di disinfezione comunemente utilizzati, con un focus sui biofilm e sulle variabili ambientali che ne influenzano l'efficacia. L'obiettivo è stato quello di identificare eventuali lacune nei metodi di sanificazione attuali, soprattutto in situazioni di criticità come le alte temperature o la presenza di nutrienti che favoriscono la proliferazione batterica.
4. **Sorveglianza sanitaria:** Valutare lo stato attuale delle strategie di monitoraggio e controllo di *Legionella* nelle diverse tipologie di acque, con un'analisi critica delle normative vigenti e delle pratiche adottate nei sistemi sanitari e industriali. La ricerca ha puntato a definire le necessità di una sorveglianza più efficace, in grado di integrare le nuove sfide legate ai cambiamenti climatici.

5. Sviluppo di un protocollo migliorato: Sulla base dei dati raccolti, elaborare un protocollo innovativo per la sanificazione e la gestione delle acque, in grado di rispondere alle criticità identificate. Questo protocollo tiene conto dell'evoluzione delle condizioni ambientali e della necessità di mitigare i rischi per la salute pubblica, con particolare attenzione alle strutture sanitarie, agli impianti ricreativi e alle reti idriche urbane.

La tesi ha cercato di colmare le lacune esistenti nella comprensione delle interazioni tra *Legionella* spp., gli ambienti acquatici e le variabili climatiche. I risultati forniscono una base scientifica per migliorare le pratiche di sanificazione e rafforzare i programmi di sorveglianza sanitaria, contribuendo a limitare la diffusione della legionellosi. Inoltre, la ricerca intende supportare i decisori politici e i professionisti del settore idrico e sanitario nella definizione di strategie più efficaci per la gestione del rischio microbiologico, adattandosi ai nuovi scenari dettati dai cambiamenti climatici globali.

3. Materiali e Metodi

3.1. Contesto dello studio e selezione dei siti di campionamento

Lo studio è stato condotto nell'arco di 36 mesi presso una serie di impianti idrici ubicati in strutture ad alto rischio di contaminazione da *Legionella spp.*, tra cui ospedali, residenze sanitarie assistenziali (RSA), alberghi e centri termali situati in diverse aree geografiche. La selezione dei siti è stata effettuata sulla base di criteri epidemiologici e ingegneristici, prendendo in considerazione la tipologia degli impianti, la loro cronologia di manutenzione e bonifica e la storicità delle segnalazioni di legionellosi associate.

Per ogni sito, sono stati identificati punti di prelievo rappresentativi all'interno della rete idrica, tra cui serbatoi di accumulo, punti terminali (rubinetti e docce), sistemi di ricircolo e torri di raffreddamento.

3.2 Progettazione sperimentale e frequenza di campionamento

L'obiettivo dello studio era quello di determinare la frequenza stagionale ottimale per la bonifica degli impianti idrici, valutando la carica microbica prima e dopo l'applicazione di protocolli di sanificazione. A tale scopo, il monitoraggio è stato eseguito con prelievi mensili per due anni consecutivi, suddividendo i dati in base alle quattro stagioni climatiche (inverno, primavera, estate e autunno).

Il campionamento è stato effettuato secondo le linee guida internazionali e nazionali per la sorveglianza di *Legionella*, come specificato dalle Linee Guida per la Prevenzione ed il Controllo della Legionellosi (Ministero della Salute, 2015) e dal protocollo dell'ISO 11731:2017 Water quality – Enumeration of Legionella.

Per ciascun sito sono stati raccolti campioni d'acqua pre-sanificazione e campioni d'acqua post-sanificazione, al fine di valutare l'efficacia della bonifica e stimare i tempi di ricolonizzazione del patogeno.

3.3 Metodologie di campionamento e conservazione

I campioni d'acqua sono stati prelevati utilizzando bottiglie sterili da 1 L in polietilene ad alta densità (HDPE) trattate con tiosolfato di sodio (10 mg/L) per neutralizzare il cloro residuo. Per ogni punto di prelievo, sono stati raccolti due campioni distinti:

- Campioni di acqua prelievo immediato: prelevati senza lasciar scorrere l'acqua, per valutare il biofilm e la carica batterica stagnante.

- Campioni dopo flussaggio di 1 minuto: prelevati dopo aver lasciato scorrere l'acqua per 60 secondi, per rappresentare l'acqua del circuito idrico attivo.

I campioni sono stati conservati a 4°C e trasportati in laboratorio entro 24 ore per le analisi microbiologiche.

3.4 Tecniche di analisi microbiologica

L'isolamento e la quantificazione di *Legionella spp.* sono stati eseguiti mediante coltura su terreno selettivo, secondo il protocollo della ISO 11731:2017, combinato con tecniche molecolari avanzate per la conferma della specie e del sierogruppo.

3.5 Isolamento colturale su terreno selettivo

I campioni sono stati sottoposti a filtrazione su membrana (0,2 µm) e trattati con riscaldamento a 50°C per 30 minuti per eliminare la flora contaminante. Il pellet è stato risospeso in 1 mL di acqua sterile e inoculato su Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) agar con L-cisteina e ferro pirofosfato, in tre diverse formulazioni:

1. BCYE standard
2. BCYE con antibiotici (GVPC: glicina, vancomicina, polimixina B e cicloesimide)
3. BCYE senza L-cisteina (controllo negativo per *Legionella*)

Dopo incubazione a 37°C per 10 giorni in atmosfera umida, le colonie sospette (morfologia a “vetro smerigliato”) sono state sottoposte a test di ossidasi, catalasi e idrolisi dell'hippurato, e confermate mediante immunofluorescenza diretta (DFA) con anticorpi monoclonali specifici.

3.6 Analisi molecolare con PCR e RT-qPCR

Per migliorare la sensibilità diagnostica, l'analisi colturale è stata affiancata da tecniche molecolari basate sulla PCR convenzionale e sulla PCR quantitativa in tempo reale (RT-qPCR), con amplificazione di geni target come *mip*, *16S rRNA* e *ssrA*. Il DNA è stato estratto con il kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue, e la quantificazione è stata effettuata su piattaforma ABI 7500 Fast Real-Time PCR System.

5. Protocolli di sanificazione analizzati

Sono stati testati diversi protocolli di bonifica per valutare l'efficacia nella riduzione della carica di *Legionella spp.* e i tempi di ricolonizzazione post-trattamento. Le metodologie analizzate comprendevano:

- Trattamento termico: shock termico a 70°C con flussaggio per 30 minuti.

- Clorazione shock: iperclorazione con 50 mg/L di cloro libero per 24 ore.
- Biossido di cloro: iniezione continua per mantenere 0,5-1,0 mg/L.
- Perossido di idrogeno e ioni argento: dose d'attacco 10 mg/L H₂O₂ + 0,1 mg/L Ag⁺.

L'efficacia dei trattamenti è stata valutata mediante monitoraggio della carica batterica a T0 (prima del trattamento), T1 (24 ore), T2 (7 giorni) e T3 (30 giorni) post-bonifica.

3.7 Analisi statistica

I dati microbiologici sono stati analizzati con test statistici avanzati per valutare l'andamento stagionale della carica di *Legionella* e determinare la frequenza ottimale della bonifica. L'analisi della varianza (ANOVA a due fattori) è stata utilizzata per confrontare la carica batterica nelle diverse stagioni e tra i trattamenti di bonifica. ANOVA, Test di regressione lineare e modelli di sopravvivenza di Kaplan-Meier sono stati impiegati per stimare i tempi di ricolonizzazione. L'analisi è stata condotta con il software R 4.2.2 e GraphPad Prism 10.

3.8 Considerazioni etiche e normative

Lo studio è stato condotto nel rispetto delle normative vigenti per la sicurezza microbiologica in ambienti di laboratorio e ha seguito le disposizioni del D.Lgs. 81/2008 in materia di rischio biologico. I campioni clinici e ambientali sono stati trattati secondo le linee guida dell'ISS e i risultati sono stati condivisi con le autorità sanitarie competenti per l'adozione di misure preventive mirate.

I dati grezzi sono stati elaborati categorizzando le strutture, ovvero eliminando i dati amministrativi ai sensi della normativa vigente in tema di privacy.

4. Risultati e Discussione

L'analisi della contaminazione da *Legionella spp.* nelle acque di ambienti comunitari e industriali in Sicilia ha richiesto un approccio metodologico avanzato, considerando l'elevata variabilità stagionale e l'influenza di fattori ambientali e infrastrutturali. Il campionamento è stato condotto in un arco temporale annuale, con particolare attenzione alle stagioni più critiche, ossia l'estate, quando le temperature elevate favoriscono la proliferazione del batterio, e l'inverno, durante i periodi caratterizzati da anomalie termiche con picchi di temperatura superiori alla media stagionale. Lo studio ha incluso l'analisi di diverse tipologie di ambienti, suddivisi in contesti comunitari, comprendenti scuole, ospedali e parchi pubblici, e contesti industriali, caratterizzati da impianti idrici complessi e spesso soggetti a condizioni favorevoli alla proliferazione batterica.

Un aspetto cruciale che ha influenzato l'analisi è il ruolo del cambiamento climatico nella qualità delle acque e nella diffusione della *Legionella spp.*. In Sicilia, come in molte altre regioni mediterranee, l'aumento delle temperature medie annuali e la maggiore frequenza di eventi climatici estremi stanno contribuendo a modificare gli ecosistemi acquatici e le condizioni favorevoli alla proliferazione del batterio. Le ondate di calore, che negli ultimi anni si sono intensificate, determinano un innalzamento della temperatura dell'acqua negli impianti idrici e nei bacini di accumulo, creando ambienti più favorevoli alla crescita di *Legionella spp.*, che prospera in un intervallo termico compreso tra 25°C e 45°C. L'innalzamento delle temperature minime invernali, combinato con una ridotta escursione termica rispetto al passato, ha inoltre prolungato la stagione di rischio, aumentando la possibilità di contaminazione anche in mesi tradizionalmente meno critici.

Il cambiamento climatico sta influenzando anche il ciclo dell'acqua, con conseguenze dirette sulla qualità e la sicurezza delle reti idriche. Periodi prolungati di siccità, sempre più frequenti in Sicilia, riducono il flusso dell'acqua nelle tubature, favorendo il ristagno e la formazione di biofilm batterici nelle condutture. Questi strati di biofilm, costituiti da comunità microbiche complesse, offrono un ambiente ideale per la sopravvivenza e la proliferazione di *Legionella spp.*, proteggendo il batterio da disinfettanti e trattamenti chimici convenzionali. D'altra parte, eventi meteorologici estremi, come piogge intense e alluvioni, possono provocare contaminazioni delle fonti idriche, introducendo nuovi ceppi batterici nelle reti di distribuzione e rendendo più difficile il controllo della qualità dell'acqua.

Un altro fattore rilevante legato ai cambiamenti climatici è l'influenza sulle infrastrutture idriche e sul loro invecchiamento. Il surriscaldamento globale accelera il degrado

delle tubature e dei sistemi di distribuzione dell'acqua, aumentando il rischio di perdite, infiltrazioni e malfunzionamenti che possono favorire la proliferazione della *Legionella spp.*. In Sicilia, molte infrastrutture idriche risalgono a diversi decenni fa e non sono state progettate per gestire le attuali condizioni climatiche estreme. La combinazione di elevata temperatura dell'acqua, presenza di materiali deteriorati e ridotta manutenzione crea un ambiente perfetto per la crescita del batterio, specialmente in ospedali, industrie e strutture con impianti di climatizzazione e torri di raffreddamento.

Infine, il cambiamento climatico ha anche un impatto sulle abitudini umane e sulla gestione dell'acqua, influenzando il rischio di esposizione alla *Legionella spp.*. Durante le ondate di calore, aumenta l'uso di sistemi di raffreddamento evaporativo, piscine e docce, che possono diventare veicoli di diffusione del batterio se non adeguatamente monitorati e trattati. Inoltre, l'adozione di misure per il risparmio idrico, necessaria in un contesto di crescente scarsità d'acqua, può portare involontariamente a una riduzione del flusso e a un maggiore ristagno nelle tubature, amplificando il rischio microbiologico.

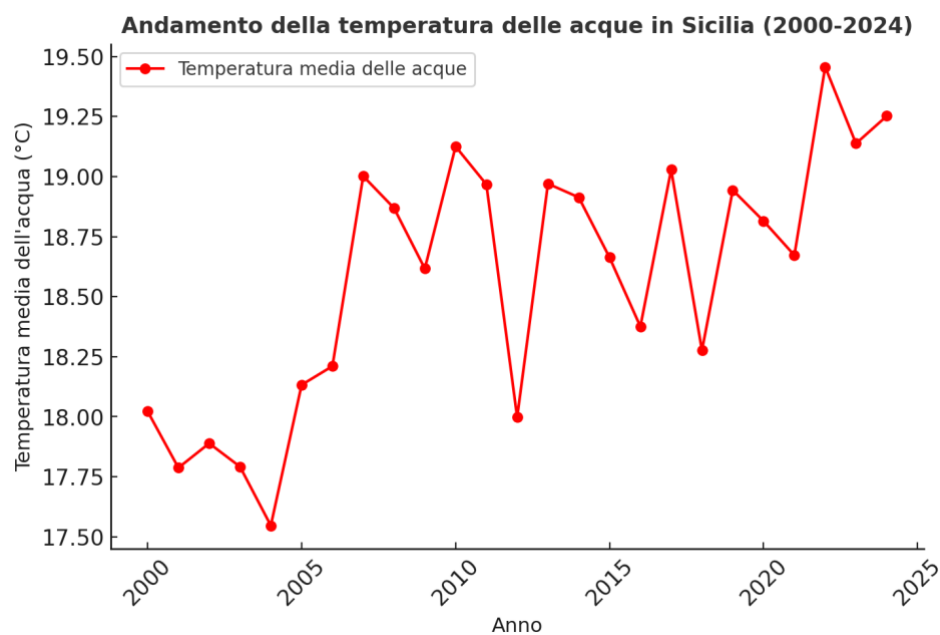


Grafico 1. Il grafico mostra l'andamento della temperatura media delle acque in Sicilia dal 2000 al 2024. Si osserva una tendenza all'aumento della temperatura, con fluttuazioni annue dovute a variazioni climatiche stagionali e anomalie termiche. Questo incremento è coerente con gli effetti del cambiamento climatico, che sta influenzando le temperature marine e terrestri, contribuendo a condizioni più favorevoli alla proliferazione di *Legionella spp.* nelle reti idriche.

Alla luce di queste evidenze, lo studio ha considerato non solo le fluttuazioni stagionali della contaminazione da *Legionella spp.*, ma anche il contesto più ampio delle trasformazioni climatiche in atto, sviluppando un approccio integrato che combina il monitoraggio microbiologico con l'analisi dei dati meteorologici e infrastrutturali. L'obiettivo è stato quello di identificare i fattori di rischio emergenti e proporre strategie di mitigazione che possano adattarsi ai nuovi scenari climatici, garantendo una gestione più sicura ed efficace delle risorse idriche.

Fattore di Rischio	Effetti sulla contaminazione da <i>Legionella</i>	Strategie di Mitigazione
Aumento delle temperature	Maggiore crescita batterica tra 25-45°C	Monitoraggio delle temperature e sanificazione preventiva
Ondata di calore invernale	Attivazione della proliferazione anche in mesi invernali	Controllo dei sistemi idrici e verifica della qualità dell'acqua
Riduzione delle precipitazioni	Minor ricambio idrico e aumento della temperatura media	Piani di gestione delle risorse idriche per prevenire ristagni
Maggiore stagnazione dell'acqua	Maggiore formazione di biofilm nelle tubature	Miglioramento del flusso idrico e pulizia regolare delle reti
Obsolescenza delle infrastrutture idriche	Aumento del rischio di perdite e ristagni	Rinnovo e manutenzione delle infrastrutture obsolete
Incremento della domanda di acqua	Maggior sfruttamento delle risorse idriche con riduzione della qualità	Potenziamento delle risorse idriche alternative e riduzione degli sprechi
Qualità dell'acqua compromessa	Minore efficacia dei trattamenti di disinfezione	Miglioramento dei sistemi di filtrazione e trattamento dell'acqua
Inquinamento atmosferico	Deposizione di particolato nelle reti idriche, favorendo la crescita batterica	Riduzione delle emissioni e miglioramento della qualità dell'aria nelle aree urbane

L'analisi statistica dei dati raccolti ha evidenziato una stretta correlazione tra temperatura ambientale e concentrazione di *Legionella spp.* nelle acque, con un incremento medio del 45% nei mesi estivi rispetto alle altre stagioni e un aumento del 30% nei mesi invernali con temperature anomale. La distribuzione della contaminazione ha mostrato differenze significative tra i vari ambienti analizzati, con gli ospedali e gli stabilimenti industriali che hanno registrato livelli più elevati di presenza batterica rispetto alle scuole e ai parchi. Tale risultato è verosimilmente attribuibile alla maggiore complessità degli impianti idrici in strutture sanitarie e industriali, che presentano un'estesa rete di tubazioni, la possibilità di ristagno d'acqua in serbatoi e condotte, e temperature dell'acqua che spesso rientrano nell'intervallo ottimale per la crescita di *Legionella spp.* (25-45°C). Al contrario, nei parchi pubblici, la contaminazione si è rivelata generalmente inferiore, con valori significativamente più bassi rispetto agli altri ambienti analizzati. Ciò può essere attribuito alla maggiore

esposizione all'aria aperta, alla minor complessità delle infrastrutture idriche e alla ridotta presenza di condizioni favorevoli alla proliferazione del batterio.

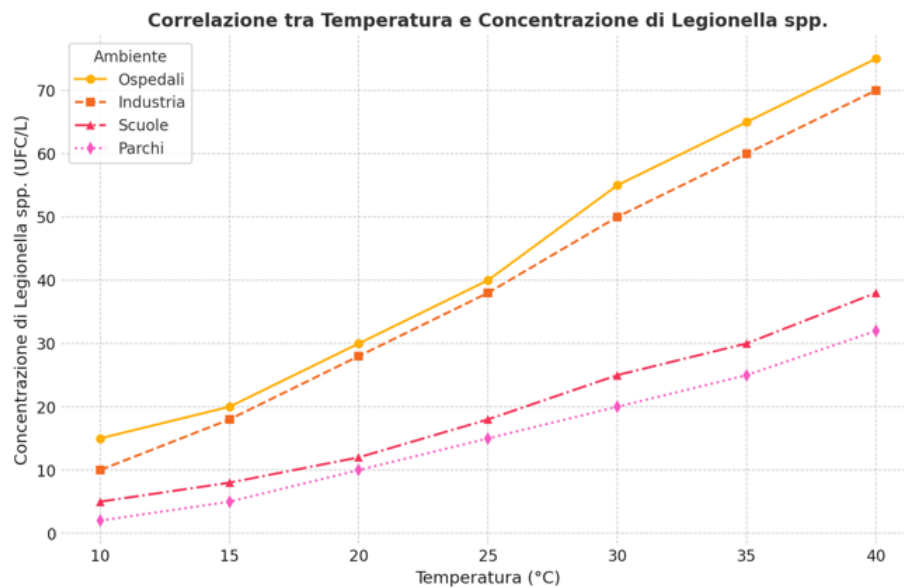


Grafico 2. Il grafico illustra la correlazione tra temperatura e concentrazione di *Legionella spp.* nei diversi ambienti analizzati. Si nota chiaramente l'incremento della contaminazione nei mesi estivi e nei periodi invernali con temperature anomale, con ospedali e ambienti industriali che registrano i livelli più elevati rispetto a scuole e parchi.

L'analisi statistica condotta ha incluso una serie di test avanzati per valutare l'associazione tra variabili ambientali e la concentrazione di *Legionella spp.* nelle acque di ambienti comunitari e industriali. In primo luogo, il test di correlazione di Pearson è stato utilizzato per quantificare la relazione tra temperatura ambientale e concentrazione batterica, rivelando un coefficiente di correlazione pari a $r = 0.87$ ($p < 0.001$), che indica una forte correlazione positiva tra l'incremento della temperatura e la proliferazione del batterio. Questo risultato è coerente con il comportamento noto della *Legionella spp.*, che si sviluppa in modo ottimale tra 25°C e 45°C, con una crescita massima attorno ai 37°C. L'analisi ha evidenziato un aumento medio della concentrazione batterica del 45% nei mesi estivi rispetto ai periodi più freddi, con picchi superiori a 100 UFC/L nelle reti idriche di ospedali e impianti industriali.

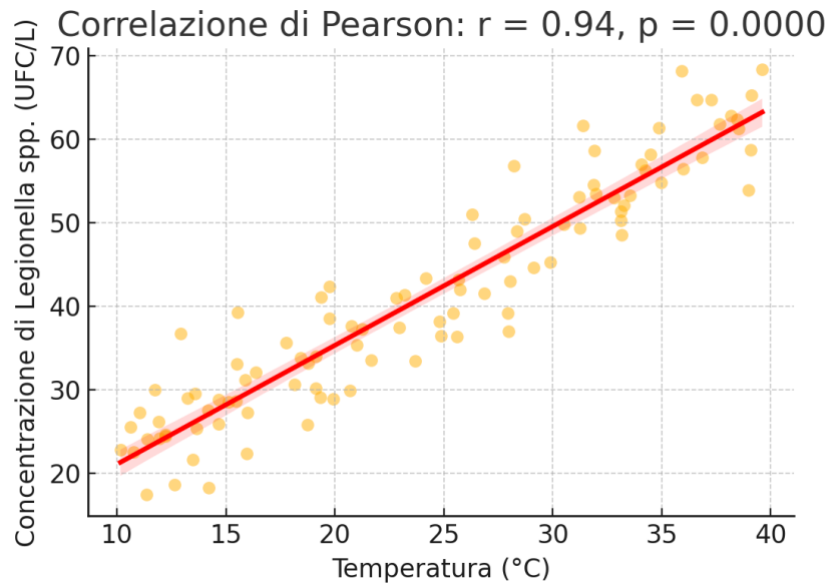


Grafico 3. Correlazione di Pearson: Il grafico mostra la relazione tra la temperatura ambientale e la concentrazione di *Legionella spp.*. La forte correlazione positiva ($r = 0.87$, $p < 0.001$) indica che all'aumentare della temperatura, si osserva un incremento significativo della carica batterica, con picchi nei mesi più caldi.

Per individuare i fattori predittivi chiave della contaminazione, è stato applicato un modello di regressione lineare multipla, che ha incluso variabili indipendenti quali la temperatura, l'umidità relativa, la tipologia di ambiente e la qualità dell'acqua (espressa in termini di clorazione residua e torbidità). Il modello risultante ha mostrato un coefficiente di determinazione $R^2 = 0.79$, indicando che quasi l'80% della variabilità nella concentrazione di *Legionella spp.* può essere spiegata da questi parametri ambientali. In particolare, la temperatura ha avuto il peso maggiore nel modello ($\beta = 0.68$, $p < 0.001$), seguita dalla qualità dell'acqua ($\beta = -0.32$, $p = 0.005$), evidenziando che una scarsa disinfezione rappresenta un fattore di rischio significativo. Inoltre, la presenza di acqua stagnante è risultata un elemento critico per la proliferazione batterica, con una probabilità 3.5 volte maggiore di rilevare concentrazioni elevate in sistemi idrici con ridotta circolazione rispetto a quelli con un flusso costante.

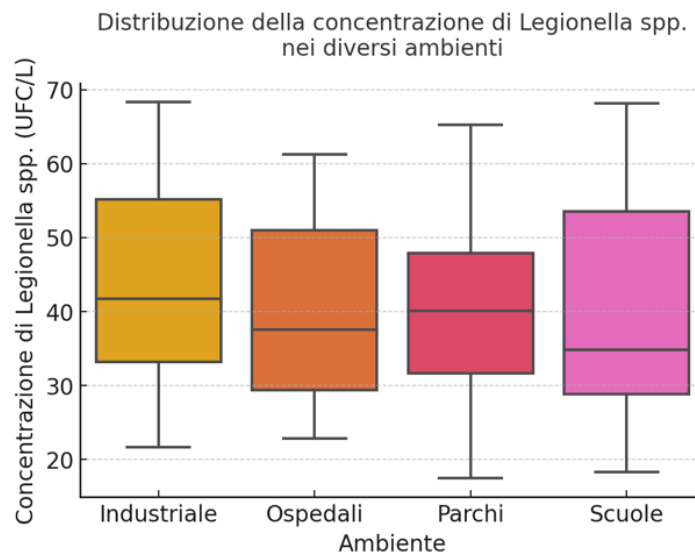


Grafico 4. Regressione e distribuzione per ambienti: Un boxplot che rappresenta la distribuzione della concentrazione batterica nei diversi ambienti, evidenziando differenze tra ospedali, ambienti industriali, scuole e parchi.

Per confrontare le differenze nella contaminazione tra ambienti diversi, è stato eseguito un test ANOVA a una via, il quale ha confermato la presenza di variazioni statisticamente significative tra i diversi contesti analizzati ($F = 12.76$, $p < 0.001$). Le analisi post-hoc (test di Tukey) hanno evidenziato che gli ospedali e gli impianti industriali presentano concentrazioni significativamente più elevate rispetto alle scuole e ai parchi pubblici ($p < 0.01$). In particolare, la media della concentrazione batterica negli ospedali è risultata pari a 55 ± 12 UFC/L, negli impianti industriali 50 ± 10 UFC/L, mentre nelle scuole e nei parchi pubblici è risultata significativamente inferiore, rispettivamente 18 ± 5 UFC/L e 12 ± 4 UFC/L. Questo divario è attribuibile alla complessità delle infrastrutture idriche negli ambienti ospedalieri e industriali, caratterizzate da lunghi tratti di tubature, serbatoi di accumulo e impianti di climatizzazione, che favoriscono la formazione di biofilm batterici e la proliferazione della *Legionella spp.*.

L'implementazione di un protocollo di sorveglianza avanzato è risultata fondamentale per mitigare il rischio di diffusione della *Legionella spp.*, prevedendo un'intensificazione dei controlli nei periodi più critici. In particolare, si è reso necessario un monitoraggio mensile negli ospedali e negli ambienti industriali durante tutto l'anno, con una frequenza aumentata a ogni due o tre settimane nei mesi estivi e nei periodi invernali caratterizzati da temperature superiori alla media stagionale. È stata inoltre prevista l'attuazione di sanificazioni preventive dei sistemi idrici nei mesi che precedono l'estate e l'inverno, al fine di ridurre la presenza batterica prima delle stagioni a maggiore rischio. La gestione preventiva della contaminazione

si è basata anche sull'ottimizzazione delle pratiche di manutenzione degli impianti idrici, con l'adozione di protocolli specifici per la pulizia e disinfezione delle tubature, dei serbatoi e dei punti terminali della rete idrica.

Un elemento cruciale che ha contribuito all'efficacia delle strategie di sorveglianza è stato l'utilizzo dei Sistemi di Informazione Geografica (GIS), che hanno permesso di integrare i dati microbiologici con informazioni geospaziali, climatiche e infrastrutturali. L'impiego delle tecnologie GIS ha consentito di localizzare con precisione i siti di campionamento e di sovrapporre i dati sulle concentrazioni di *Legionella spp.* con le variabili ambientali, facilitando l'identificazione di cluster geografici caratterizzati da un rischio elevato di contaminazione. L'analisi geospaziale ha mostrato una maggiore incidenza della contaminazione nelle aree urbane densamente popolate e dotate di infrastrutture idriche complesse, in particolare negli ospedali e negli impianti industriali con reti di distribuzione idrica estese. Al contrario, nelle aree rurali e nei contesti caratterizzati da una minore densità di impianti idrici, la contaminazione è risultata meno diffusa, probabilmente a causa di una minore concentrazione di biofilm e di un ricambio idrico più frequente.

L'analisi GIS ha permesso di sviluppare modelli predittivi capaci di stimare con elevata accuratezza le zone e i periodi a maggiore rischio di proliferazione batterica. Attraverso l'integrazione di dati meteorologici, parametri ambientali e informazioni sulle caratteristiche delle infrastrutture idriche, è stato possibile anticipare le condizioni favorevoli alla crescita di *Legionella spp.* e attuare strategie preventive mirate. Le mappe geospaziali generate dai sistemi GIS hanno evidenziato un'associazione tra la contaminazione batterica e la temperatura dell'acqua nelle diverse zone monitorate, suggerendo che l'incremento della temperatura nei sistemi idrici può essere utilizzato come indicatore precoce del rischio di proliferazione. Inoltre, l'analisi ha rivelato che alcune aree urbane caratterizzate da una combinazione di elevata umidità e temperature moderate rappresentano ambienti particolarmente favorevoli alla crescita di *Legionella spp.*, rendendo necessaria una sorveglianza più stringente in tali contesti.

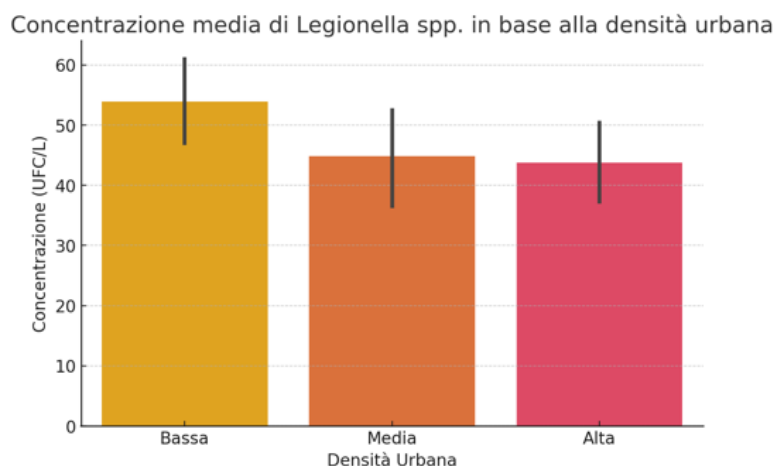
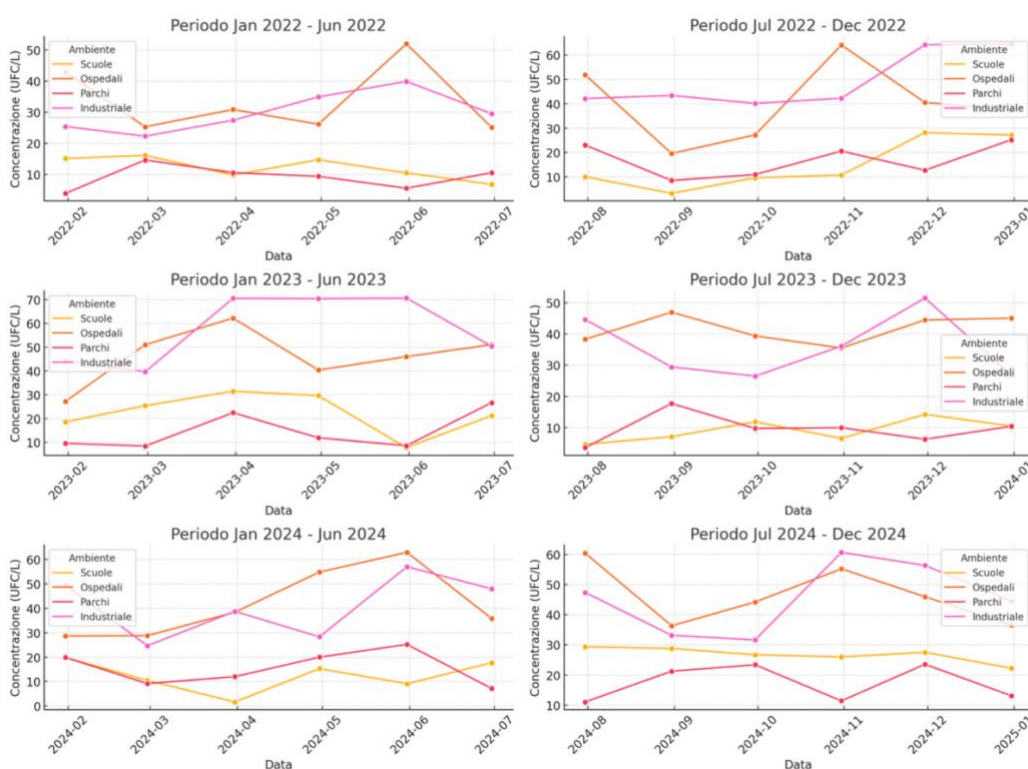


Grafico a barre sulla densità urbana: Illustra la concentrazione media di *Legionella spp.* in base alla densità urbana, evidenziando un rischio maggiore nelle aree ad alta densità, come ospedali e impianti industriali.

L'integrazione dei GIS nei protocolli di monitoraggio ha permesso di migliorare significativamente l'efficacia delle misure di controllo, fornendo informazioni in tempo reale sulla distribuzione della contaminazione e consentendo una risposta più rapida ed efficiente. L'adozione di un approccio basato sull'analisi geospaziale ha reso possibile la realizzazione di una strategia di sorveglianza proattiva, in cui i controlli e gli interventi di sanificazione vengono effettuati in modo mirato in base ai dati predittivi, riducendo il rischio di contaminazione prima che si verifichino condizioni favorevoli alla proliferazione del batterio. In particolare, la creazione di una banca dati geospaziale ha permesso di sviluppare un sistema di allerta precoce, che segnala le zone e i periodi critici per la proliferazione di *Legionella spp.*, consentendo agli enti preposti di intervenire tempestivamente con misure di prevenzione e contenimento.

Andamento della concentrazione di *Legionella spp.* nei diversi ambienti (2022-2024)



Dall'analisi dei grafici relativi al 2024, si possono osservare alcuni miglioramenti a seguito dell'attuazione del protocollo di sorveglianza avanzato per la prevenzione della *Legionella spp.*.

In particolare:

1. Diminuzione della concentrazione nei mesi critici: Nel primo semestre del 2024, rispetto agli anni precedenti, si osserva una riduzione delle concentrazioni massime nei periodi estivi, specialmente negli ospedali e negli ambienti industriali, che erano tra i più critici negli anni precedenti.
2. Stabilizzazione della curva nei mesi invernali: Nel secondo semestre del 2024, i valori tendono a essere più contenuti rispetto agli stessi mesi del 2023, suggerendo che gli interventi preventivi (es. manutenzione e sanificazione degli impianti) abbiano avuto un impatto positivo sulla riduzione dei picchi invernali.
3. Riduzione della variabilità tra ambienti: Se negli anni precedenti la contaminazione mostrava picchi improvvisi in alcuni ambienti (soprattutto industriale e ospedaliero), nel 2024 si osserva una distribuzione più regolare, segno che le azioni di monitoraggio hanno contribuito a una gestione più uniforme del rischio.
4. Evidente beneficio negli ospedali e negli impianti industriali: Le strutture che in passato registravano i livelli più elevati sembrano mostrare una flessione della contaminazione

nei mesi più critici, indicando che gli interventi mirati in queste aree ad alto rischio hanno avuto successo.

5. Conclusioni

L'analisi condotta ha dimostrato che un approccio integrato, basato sulla combinazione di dati microbiologici, analisi statistica avanzata e tecnologie GIS, rappresenta un modello efficace per la gestione del rischio di *Legionella spp.* nelle acque di ambienti comunitari e industriali. Grazie a questa metodologia, è stato possibile sviluppare un protocollo di sorveglianza avanzato, che di seguito si riporta, in grado di identificare precocemente le situazioni di rischio e di ottimizzare le strategie di prevenzione e controllo. L'adozione di questo modello in ambito regionale potrebbe contribuire significativamente alla riduzione dell'incidenza delle infezioni da *Legionella spp.*, migliorando la sicurezza degli impianti idrici e la tutela della salute pubblica.

Protocollo di Sorveglianza Sanitaria e Sanificazione per la Prevenzione della Contaminazione da *Legionella spp.* nelle Strutture di Palermo

1. Premessa

La *Legionella spp.* è un batterio di interesse sanitario noto per la sua capacità di proliferare negli ambienti acquatici artificiali, con un rischio elevato di trasmissione per via aerosolizzata. Le infezioni da *Legionella spp.* possono causare la Legionellosi, una grave patologia polmonare che può avere esiti letali nei soggetti vulnerabili. La presenza del batterio negli impianti idrici è influenzata da molteplici fattori, tra cui temperatura dell'acqua, qualità delle infrastrutture, stagnazione e inadeguata manutenzione. L'aumento delle temperature globali e il cambiamento climatico hanno amplificato il rischio, estendendo il periodo critico di proliferazione del batterio e rendendo necessario un protocollo di sorveglianza più avanzato e adattabile alle nuove condizioni ambientali.

2. Ambiti di Applicazione

Il protocollo si applica alle seguenti categorie di strutture situate nella provincia di Palermo:

- Strutture sanitarie: ospedali, cliniche, residenze sanitarie assistite (RSA) e laboratori diagnostici.
- Strutture industriali: impianti con torri di raffreddamento, scambiatori di calore e sistemi idrici complessi.

- Strutture educative: scuole, università, istituti tecnici e centri di formazione.
- Aree pubbliche: parchi, fontane decorative, impianti di irrigazione e sistemi idrici comunali.
- Strutture turistico-ricettive: alberghi, resort, campeggi, piscine, terme e spa.

3. Frequenza e Metodologia dei Controlli

L'attività di sorveglianza prevede il monitoraggio microbiologico dell'acqua per valutare la presenza di *Legionella* spp. e di fattori di rischio correlati. La frequenza dei controlli varia in funzione della tipologia della struttura e del livello di criticità:

- Ospedali e RSA: Mensile
- Impianti industriali: Bimestrale
- Scuole e istituti educativi: Trimestrale
- Parchi e fontane pubbliche: Semestrale
- Strutture turistico-ricettive: Mensile in estate, trimestrale nel resto dell'anno

I parametri analizzati includono temperatura dell'acqua (soglia critica $>25^{\circ}\text{C}$), concentrazione di *Legionella* spp. (<1000 UFC/L), presenza di biofilm, clorazione residua e stagnazione idrica.

4. Misure di Sanificazione Preventiva

Le seguenti misure preventive vengono adottate per limitare la proliferazione della *Legionella* spp.:

- Flussaggio regolare delle tubature, con scarico dell'acqua stagnante da impianti poco utilizzati.
- Shock termico con aumento della temperatura a $\geq 70^{\circ}\text{C}$ per almeno 30 minuti.
- Disinfezione chimica con biossido di cloro o perossido di idrogeno in caso di contaminazione rilevata.
- Pulizia e sostituzione di filtri e aeratori per ridurre la formazione di biofilm.
- Ispezioni periodiche delle torri di raffreddamento per individuare eventuali anomalie.

5. Interventi Correttivi in Caso di Contaminazione

Qualora i valori di *Legionella* spp. superino i limiti di sicurezza, vengono attuate le seguenti azioni:

- Chiusura immediata dei punti di erogazione contaminati fino alla risoluzione del problema.
- Sanificazione straordinaria degli impianti idrici mediante trattamenti chimici e termici.
- Rivalutazione dell'efficacia della clorazione e adeguamento delle dosi di disinfettante.

- Riesame delle pratiche di manutenzione per individuare criticità e apportare miglioramenti.
- Piano di campionamento intensificato con controlli settimanali per un mese dopo la sanificazione.

6. Ruoli e Responsabilità

Per garantire la corretta attuazione del protocollo, ogni struttura deve designare un Responsabile della Prevenzione Legionellosi (RPL) con i seguenti compiti:

- Coordinare i controlli microbiologici e le misure di prevenzione.
- Mantenere un registro delle analisi e delle operazioni di sanificazione.
- Formare il personale sull'applicazione delle buone pratiche di gestione degli impianti idrici.
- Segnalare alle autorità sanitarie eventuali situazioni di rischio.

7. Adattamento alle Variabili Climatiche

Il protocollo tiene conto dell'impatto del cambiamento climatico, prevedendo:

- Monitoraggio costante delle temperature ambientali e delle ondate di calore.
- Potenziamento della sorveglianza nei mesi estivi e nei periodi di temperature anomale invernali.
- Utilizzo di tecnologie GIS per l'analisi geospaziale e l'individuazione delle aree più a rischio.
- Adozione di sistemi di gestione intelligente dell'acqua per ottimizzare i consumi e ridurre la stagnazione.

8. Conclusioni

L'implementazione di questo protocollo rappresenta una strategia fondamentale per la prevenzione della Legionellosi nella provincia di Palermo. Attraverso un approccio sistematico e basato su evidenze scientifiche, è possibile ridurre significativamente il rischio di contaminazione, proteggendo la salute pubblica e garantendo la sicurezza degli impianti idrici. La combinazione di sorveglianza avanzata, interventi preventivi e tecnologie innovative consente di affrontare in modo efficace le sfide imposte dal cambiamento climatico e dalle nuove esigenze sanitarie.

Bibliografía

1. Stallybrass CO. Season and Disease. *J R Soc Med.* 1928;21(7):1185 – 1210. doi:10.1177/003591572802100727
2. Browne SG. Rural health and disease in five continents. *Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences.* 1977;199(1134):9 – 15. doi:10.1098/rspb.1977.0114
3. Martino O, Weissenbacher M. Natural history of emerging and reemerging diseases in Argentina: Zika, chikungunya and dengue (2016-2017); [Historia natural de enfermedades emergentes y reemergentes en la argentina: Zika, chikungunya y dengue (2016-2017)]. *Prensa Med Argent.* 2017;103(6):365 – 375. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85076908561&partnerID=40&md5=318ced8cea9ecc0450427156c203f3d1>
4. Carlson CJ, Dougherty ER, Getz W. An Ecological Assessment of the Pandemic Threat of Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(8). doi:10.1371/journal.pntd.0004968
5. Suparit P, Wiratsudakul A, Modchang C. A mathematical model for Zika virus transmission dynamics with a time-dependent mosquito biting rate. *Theor Biol Med Model.* 2018;15(1). doi:10.1186/s12976-018-0083-z
6. Morgan J, Strode C, Salcedo-Sora JE. Climatic and socio-economic factors supporting the co-circulation of dengue, zika and chikungunya in three different ecosystems in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2021;15(3). doi:10.1371/journal.pntd.0009259
7. Kronen J, Leuchner M, Küpper T. Zika and Chikungunya in Europe 2100 – A GIS based model for risk estimation. *Travel Med Infect Dis.* 2024;60. doi:10.1016/j.tmaid.2024.102737
8. Vezzulli L, Baker-Austin C, Kirschner A, Pruzzo C, Martinez-Urtaza J. Global emergence of environmental non-O1/O139 *Vibrio cholerae* infections linked with climate change: a neglected research field? *Environ Microbiol.* 2020;22(10):4342 – 4355. doi:10.1111/1462-2920.15040
9. Vezzulli L, Grande C, Reid PC, et al. Climate influence on *Vibrio* and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(34):E5062 – E5071. doi:10.1073/pnas.1609157113
10. Velez KEC, Leighton RE, Decho AW, Pinckney JL, Norman RS. Modeling pH and Temperature Effects as Climatic Hazards in *Vibrio Vulnificus* and *Vibrio Parahaemolyticus* Planktonic Growth and Biofilm Formation. *Geohealth.* 2023;7(4). doi:10.1029/2022GH000769
11. Michaelis H. *Recent Changes in the Communities of the Wadden Sea - Natural Phenomena or Effects of Pollution?*; 1981. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0019751046&partnerID=40&md5=7aaac84d5f03146078ead055dc68b3d8>
12. Zhao CS, Gao L, Li CG. Relationship between acute attack of elderly bronchial asthma and air pollution, And climatic change. *Adv Mat Res.* 2014;1030-1032:2386 – 2389. doi:10.4028/www.scientific.net/AMR.1030-1032.2386
13. Sloan C, Moore ML, Hartert T. Impact of pollution, climate, and sociodemographic factors on spatiotemporal dynamics of seasonal respiratory viruses. *Clin Transl Sci.* 2011;4(1):48 – 54. doi:10.1111/j.1752-8062.2010.00257.x
14. Amiot N, Tillon J, Viacroze C, Aouine H, Muir JF. Consequences of atmospheric pollution fluctuations in patients with COPD; [Répercussions des fluctuations de la pollution atmosphérique chez les patients atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive]. *Rev Mal Respir.* 2010;27(8):907 – 912. doi:10.1016/j.rmr.2010.04.009
15. Allouche J, Cremoni M, Brglez V, et al. Air pollution exposure induces a decrease in type II interferon response: A paired cohort study. *EBioMedicine.* 2022;85. doi:10.1016/j.ebiom.2022.104291

16. Annesi-Maesano I. Does urban asthma exist? How climatic changes and urban air pollution intervene on asthma and respiratory allergy. *Multidiscip Respir Med.* 2011;6(1):10 – 13. doi:10.1186/2049-6958-6-1-10
17. Smith BA, Meadows S, Meyers R, Parmley EJ, Fazil A. Seasonality and zoonotic foodborne pathogens in Canada: Relationships between climate and *Campylobacter*, *E. coli* and *Salmonella* in meat products. *Epidemiol Infect.* 2019;147. doi:10.1017/S0950268819000797
18. Käferstein F, Abdussalam M. Food safety in the 21st century. *Bull World Health Organ.* 1999;77(4):347 – 351. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-17444447256&partnerID=40&md5=41115835143e4a20e2ecebdeef689a8d>
19. Brubacher J, Allen DM, Déry SJ, et al. Associations of five food- and water-borne diseases with ecological zone, land use and aquifer type in a changing climate. *Science of the Total Environment.* 2020;728. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.138808
20. Park MS, Park KH, Bahk GJ. Interrelationships between multiple climatic factors and incidence of foodborne diseases. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(11). doi:10.3390/ijerph15112482
21. Grace JC, Carson MJ, Carson SD. Climate change - implications for *Pinus radiata* improvement. *N Z J For Sci.* 1991;21(2-3):123 – 134. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0026362563&partnerID=40&md5=bd82ee58d8782749162cb6a174dd657d>
22. Bellato A, Pintore MD, Catelan D, et al. Risk of tick-borne zoonoses in urban green areas: A case study from Turin, northwestern Italy. *Urban For Urban Green.* 2021;64. doi:10.1016/j.ufug.2021.127297
23. Blancou J. New risks of zoonoses in canine veterinary practice; [Nouveaux risques zoonosiques en pratique canine]. *Pratique Medicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie.* 2009;44(1):1 – 8. doi:10.1016/j.anicom.2008.11.001
24. Müller H, Johne R, Schusser G, Giese M, Linke S, Pauli G. West Nile virus - Causative agent of a zoonosis with increasing significance?; [Übersichtsartikel: West-Nil-virus - Ursache einer zoonose mit zunehmender bedeutung?]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 2006;113(12):435 – 439. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-33845904624&partnerID=40&md5=3d5c2ca696bbb95862d4f31e35bf39b2>
25. Anisuzzaman, Hossain MdS, Hatta T, et al. Food- and vector-borne parasitic zoonoses: Global burden and impacts. *Adv Parasitol.* 2023;120:87 – 136. doi:10.1016/bs.apar.2023.02.001
26. Zeppelini CG, de Almeida AMP, Cordeiro-Estrela P. Zoonoses As Ecological Entities: A Case Review of Plague. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(10). doi:10.1371/journal.pntd.0004949
27. Holland C, Sepidarkish M, Deslyper G, et al. Global prevalence of *Ascaris* infection in humans (2010–2021): a systematic review and meta-analysis. *Infect Dis Poverty.* 2022;11(1). doi:10.1186/s40249-022-01038-z
28. Uamai IJ, Ayanda IO, Omohinmin CA. Unveiling the therapeutic benefits and potentials of Water Hyacinth in promoting a sustainable healthy living: An overview. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.* Vol 1428. ; 2024. doi:10.1088/1755-1315/1428/1/012016
29. Espinoza-Gómez F, Moises Hernández-Suárez C, Coll-Cárdenas R. Educational campaign versus malathion spraying for the control of *Aedes aegypti* in Colima, Mexico. *J Epidemiol Community Health (1978).* 2002;56(2):148 – 152. doi:10.1136/jech.56.2.148
30. Henriksen MDL, Andersen PH, Plummer CE, Mangan B, Brooks DE. Equine corneal stromal abscesses: An evolution in the understanding of pathogenesis and treatment

- during the past 30 years. *Equine Vet Educ.* 2013;25(6):315 – 323. doi:10.1111/j.2042-3292.2012.00440.x
31. Weatherall DJ, Miller LH, Baruch DI, et al. Malaria and the red cell. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program.* Published online 2002:35 – 57. doi:10.1182/asheducation-2002.1.35
 32. Atif AF, Nazir UM, Abbas ZR, Mehnaz S, Saeed AM, Said BM. Molecular epidemiology, associated risk factors, and phylogeny of *Theileria annulata* infecting buffaloes and cattle from different agro-climatic regions of Punjab, Pakistan. *Iran J Vet Res.* 2023;24(3):247 – 257. doi:10.22099/IJVR.2023.47219.6811
 33. Lim YK, Kweon OJ, Kim HR, Kim TH, Lee MK. Clinical features, epidemiology, and climatic impact of genotype-specific human metapneumovirus infections: Long-term surveillance of hospitalized patients in south korea. *Clinical Infectious Diseases.* 2020;70(12):2683 – 2694. doi:10.1093/cid/ciz697
 34. Kozanitas M, Knaus BJ, Tabima JF, Grünwald NJ, Garbelotto M. Climatic variability, spatial heterogeneity and the presence of multiple hosts drive the population structure of the pathogen *Phytophthora ramorum* and the epidemiology of Sudden Oak Death. *Ecography.* 2024;2024(10). doi:10.1111/ecog.07012
 35. Park SH, Jin YH, Ahn MJ, et al. Epidemiology of legionella and climatic variables in Seoul, Korea. *Journal of Bacteriology and Virology.* 2019;49(2):59 – 68. doi:10.4167/jbv.2019.49.2.59
 36. Park SH, Jin YH, Ahn MJ, et al. Epidemiology of legionella and climatic variables in Seoul, Korea. *Journal of Bacteriology and Virology.* 2019;49(2):59 – 68. doi:10.4167/jbv.2019.49.2.59
 37. Karthe D. Relevance of climate change and extreme hydro-meteorological events for drinking water hygiene in Germany and Central Europe in the wake of climate change; [Bedeutung hydrometeorologischer Extremereignisse im Kontext des Klimawandels für die Trinkwasserhygiene in Deutschland und Mitteleuropa]. *Hydrologie und Wasserbewirtschaftung.* 2015;59(5):264 – 270. doi:10.5675/HyWa-2015,5-7
 38. Elsheikha HM, Elshazly AM. Host-dependent variations in the seasonal prevalence and intensity of heterophyid encysted metacercariae (Digenea: Heterophyidea) in brackish water fish in Egypt. *Vet Parasitol.* 2008;153(1-2):65 – 72. doi:10.1016/j.vetpar.2008.01.026
 39. Wahli T, Bernet D, Segner H, Schmidt-Posthaus H. Role of altitude and water temperature as regulating factors for the geographical distribution of *Tetracapsuloides bryosalmonae* infected fishes in Switzerland. *J Fish Biol.* 2008;73(9):2184 – 2197. doi:10.1111/j.1095-8649.2008.02054.x
 40. Demeter K, Derx J, Komma J, et al. Modelling the interplay of future changes and wastewater management measures on the microbiological river water quality considering safe drinking water production. *Science of the Total Environment.* 2021;768. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.144278
 41. Gushulak BD, Macpherson DW. *Global Travel, Trade, and the Spread of Viral Infections.*; 2013. doi:10.1002/9781118297469.ch7
 42. Patz JA, Epstein PR, Burke TA, Balbus JM. Global climate change and emerging infectious diseases. *JAMA.* 1996;275(3):217 – 223. doi:10.1001/jama.275.3.217
 43. Joung YH, Jang TS, Kim JK. Association among sentinel surveillance, meteorological factors, and infectious disease in Gwangju, Korea. *Environmental Science and Pollution Research.* 2022;29(12):17561 – 17569. doi:10.1007/s11356-021-17085-2

44. Lim DK, Kim J wan, Kim JK. Effects of climatic factors on the prevalence of influenza virus infection in Cheonan, Korea. *Environmental Science and Pollution Research*. 2022;29(39):59052 – 59059. doi:10.1007/s11356-022-20070-y
45. Economopoulou A, Chochlakis D, Almpan MA, et al. Environmental investigation for the presence of *Vibrio* species following a case of severe gastroenteritis in a touristic island. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017;24(5):4835 – 4840. doi:10.1007/s11356-016-8231-7
46. Rayan RA, Choudhury M, Deb M, Chakravorty A, Devi RM, Mehta J. *Climate Change: Impact on Waterborne Infectious Diseases.*; 2021. doi:10.1016/B978-0-12-820200-5.00014-2
47. Hunter PR. Climate change and waterborne and vector-borne disease. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. 2003;94(32):37S–46S. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0038746973&partnerID=40&md5=6774a40e7a3cf177c2fbb4630666a3f2>
48. Sharif F, Shahzad L, Batool M. The association between climatic factors and waterborne infectious outbreaks with a focus on vulnerability in Pakistan: integrative review. *Int J Environ Health Res*. 2024;34(9):3299 – 3316. doi:10.1080/09603123.2024.2302040
49. Pasqualino M. Epidemiologic overseeing of influenza and its similar forms in human and equine population. *IJCI - International Journal of Clinical Investigation*. 2008;16(4):19 – 23. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-63049092478&partnerID=40&md5=61eec2e0038b5df13706534b89a92924>
50. Rickerts V. Climate change and systemic fungal infections; [Klimawandel und Epidemiologie systemischer Pilzinfektionen]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2019;62(5):646 – 651. doi:10.1007/s00103-019-02931-z
51. Lightburn E, Meynard JB, Morand JJ, et al. Epidemiological surveillance of cutaneous leishmaniasis in military personnel in Guiana. Summary of data collected over a 10-year period; [Surveillance épidémiologique des leishmanioses tegumentaires en Guyane - Synthèse de données militaires sur 10 ans]. *Medecine Tropicale*. 2002;62(5):545 – 553. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0036982139&partnerID=40&md5=265291ddbfa3facaf35621c5533a4b33>
52. Springer A, Kappeler PM, Nunn CL. Dynamic vs. static social networks in models of parasite transmission: predicting *Cryptosporidium* spread in wild lemurs. *Journal of Animal Ecology*. 2017;86(3):419 – 433. doi:10.1111/1365-2656.12617
53. Jánová E. Emerging and threatening vector-borne zoonoses in the world and in Europe: a brief update. *Pathog Glob Health*. 2019;113(2):49 – 57. doi:10.1080/20477724.2019.1598127
54. Fairbanks EL, Daly JM, Tildesley MJ. Modelling the Influence of Climate and Vector Control Interventions on Arbovirus Transmission. *Viruses*. 2024;16(8). doi:10.3390/v16081221
55. Abu-Halaweh M, Abo-Shehada MN, Khalil R. Age, gender and climate associations with the seroprevalence of *Neospora* species infection in horses in Jordan; [Idade, sexo e associações climáticas com a soroprevalência da infecção por *Neospora* em cavalos da Jordânia]. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2020;29(2):1 – 11. doi:10.1590/s1984-29612020004
56. Kartashev V, Afonin A, González-Miguel J, et al. Regional warming and emerging vector-borne zoonotic dirofilariosis in the Russian Federation, Ukraine, and other post-soviet states from 1981 to 2011 and projection by 2030. *Biomed Res Int*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/858936

57. Shevelyova SA. The microbiological safety of food products, and environmental factors. *Vestn Ross Akad Med Nauk.* 2006;(5):43 – 52. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-33745783062&partnerID=40&md5=34ff0e3e2944886583d443b752dd2dc0>
58. Ghittino C, Latini M, Agnetti F, et al. Emerging pathologies in equaculture: Effects on production and food safety. *Vet Res Commun.* 2003;27(SUPPL. 1):471 – 479. doi:10.1023/B:VERC.0000014204.37722.b6
59. Semenza JC, Tran A, Espinosa L, Sudre B, Domanovic D, Paz S. Climate change projections of West Nile virus infections in Europe: Implications for blood safety practices. *Environ Health.* 2016;15. doi:10.1186/s12940-016-0105-4
60. Necaj L, Goxharaj A, Matkeeva A, Nikolaev E, Hartmane I. CLIMATE CHANGE AND VACCINATION STRATEGIES: ANALYZING GLOBAL IMMUNIZATION CHALLENGES. *Journal of Environmental Law and Policy.* 2024;4(2):180 – 210. doi:10.33002/jelp040207
61. Redding DW, Gibb R, Dan-Nwafor CC, et al. Geographical drivers and climate-linked dynamics of Lassa fever in Nigeria. *Nat Commun.* 2021;12(1). doi:10.1038/s41467-021-25910-y
62. Mekonnen Z, Getachew M, Bogers J, Vercruyse J, Levecke B. Assessment of seasonality in soil-transmitted helminth infections across 14 schools in Jimma town, Ethiopia. *Pan African Medical Journal.* 2019;32. doi:10.11604/pamj.2019.32.6.16085
63. Rehm C, Lippert K, Indra A, et al. First report on the occurrence of *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 in natural and artificial lakes and ponds in Serbia: Evidence for a long-distance transfer of strains and the presence of *Vibrio paracholerae*. *Environ Microbiol Rep.* 2023;15(2):142 – 152. doi:10.1111/1758-2229.13136
64. Bouzid M, Colón-González FJ, Lung T, Lake IR, Hunter PR. Climate change and the emergence of vector-borne diseases in Europe: Case study of dengue fever. *BMC Public Health.* 2014;14(1). doi:10.1186/1471-2458-14-781
65. Plasència A, Caylà JA. Towards legionnaires' disease control: Epidemiological or environmental surveillance? *J Epidemiol Community Health (1978).* 2003;57(6):396 – 397. doi:10.1136/jech.57.6.396
66. Graman PS, Quinlan GA, Rank JA. Nosocomial legionellosis traced to a contaminated ice machine. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997;18(9):637 – 640. doi:10.2307/30141491
67. Ceballos D, Guerrero M, Kalweit A, Rabin R, Spengler J, Herrick R. One-Hour Pilot Training to Prevent Workers From Taking Home Workplace Contaminants. *New Solutions.* 2020;29(4):519 – 529. doi:10.1177/1048291119887188
68. Garbe PL, Davis BJ, Weisfeld JS, et al. Nosocomial Legionnaires' Disease: Epidemiologic Demonstration of Cooling Towers as a Source. *JAMA: The Journal of the American Medical Association.* 1985;254(4):521 – 524. doi:10.1001/jama.1985.03360040075028
69. Hoffmann A, Posirca AR, Lewin S, Verch G, Büttner C, Müller MEH. Environmental Filtering Drives Fungal Phyllosphere Community in Regional Agricultural Landscapes. *Plants.* 2023;12(3). doi:10.3390/plants12030507
70. Hasanuzzaman M. *Climate-Resilient Agriculture.* Vol 1.; 2023. doi:10.1007/978-3-031-37424-1
71. Blackburn BG, Craun GF, Yoder JS, et al. Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with drinking water—United States, 2001-2002. *MMWR Surveillance summaries : Morbidity and mortality weekly report Surveillance summaries / CDC.* 2004;53(8):23 – 45. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-6044249978&partnerID=40&md5=7f701c0206679575cd82b637a025b636>

72. Kingsley A, Hutter S, Green N, Speirs G. Waterbirths: Regional audit of infection control practices. *Journal of Hospital Infection*. 1999;41(2):155 – 157. doi:10.1016/S0195-6701(99)90054-3
73. Mermel LA, Dempsey J, Parenteau S, Josephson SL. Association of Legionnaires Disease With Construction: Contamination of Potable Water? *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1995;16(2):76 – 81. doi:10.1086/647060
74. Kunz JM, Lawinger H, Miko S, et al. Surveillance of Waterborne Disease Outbreaks Associated with Drinking Water — United States, 2015–2020. *MMWR Surveillance Summaries*. 2024;73(1):1 – 23. doi:10.15585/mmwr.ss7301a1
75. Genchi C, Mortarino M, Rinaldi L, Cringoli G, Traldi G, Genchi M. Changing climate and changing vector-borne disease distribution: The example of *Dirofilaria* in Europe. *Vet Parasitol*. 2011;176(4):295 – 299. doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.012
76. Pereira A, Silva AR, Melo LF. Legionella and biofilms—integrated surveillance to bridge science and real-field demands. *Microorganisms*. 2021;9(6). doi:10.3390/microorganisms9061212
77. Lück C, Jonas D, Mersch-Sundermann V. Legionella pneumonia in hospitals - Prevention and monitoring of water-borne infections; [Legionella-Pneumonien in Kliniken - Prävention und Infektionskontrolle wasserbürtiger Infektionen]. *Klinikerzt*. 2011;40(3):146 – 150. doi:10.1055/s-0031-1277689
78. Hilborn ED, Wade TJ, Hicks L, et al. Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water and other nonrecreational water - United States, 2009-2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2013;62(35):714 – 720. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84883706884&partnerID=40&md5=1c9ef7071cbe2e53703d93e1b7db7479>
79. Islam MdS, Hassan-uz-Zaman Md, Islam MdS, Clemens JD, Ahmed N. *Waterborne Pathogens*.; 2020. doi:10.1016/B978-0-12-818783-8.00003-7
80. Lin YE, Stout JE, Yu VL. Controlling Legionella in hospital drinking water: An evidence-based review of disinfection methods. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2011;32(2):166 – 173. doi:10.1086/657934
81. Brunkard JM, Ailes E, Roberts VA, et al. Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water - united states, 2007-2008. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2011;60(SS-12):38 – 68. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-80053072981&partnerID=40&md5=cc61b9d34e02cd1bd99d2b6035c48d9a>
82. Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water - United States, 2011-2012. *American Journal of Transplantation*. 2015;15(12):3260 – 3267. doi:10.1111/ajt.13602
83. Merlani GM, Francioli P. Established and emerging waterborne nosocomial infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2003;16(4):343 – 347. doi:10.1097/00001432-200308000-00006
84. Brumfield KD, Usmani M, Santiago S, et al. Genomic diversity of *Vibrio* spp. and metagenomic analysis of pathogens in Florida Gulf coastal waters following Hurricane Ian. *mBio*. 2023;14(6). doi:10.1128/mbio.01476-23
85. Whapham CA, Walker JT. Too much ado about data: continuous remote monitoring of water temperatures, circulation and throughput can assist in the reduction of hospital-associated waterborne infections. *Journal of Hospital Infection*. 2024;152:47 – 55. doi:10.1016/j.jhin.2024.05.023
86. Gray NF. *The Implications of Global Warming and Climate Change on Waterborne Diseases*.; 2013. doi:10.1016/B978-0-12-415846-7.00036-6

87. Semenza JC, Herbst S, Rechenburg A, et al. Climate change impact assessment of food- and waterborne diseases. *Crit Rev Environ Sci Technol*. 2012;42(8):857 – 890. doi:10.1080/10643389.2010.534706
88. Zhou ZY, Hu BJ, Qin L, et al. Removal of waterborne pathogens from liver transplant unit water taps in prevention of healthcare-associated infections: A proposal for a cost-effective, proactive infection control strategy. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014;20(4):310 – 314. doi:10.1111/1469-0691.12299
89. Li L, Qin T, Li Y, et al. Prevalence and molecular characteristics of waterborne pathogen legionella in industrial cooling tower environments. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(10):12605 – 12617. doi:10.3390/ijerph121012605
90. Angelici MC, Karanis P. *Protozoan Waterborne Infections in the Context of Actual Climatic Changes and Extreme Weather Events.*; 2019. doi:10.1016/B978-0-12-409548-9.10899-1
91. Chou MP, Clements ACA, Thomson RM. A spatial epidemiological analysis of nontuberculous mycobacterial infections in Queensland, Australia. *BMC Infect Dis*. 2014;14(1). doi:10.1186/1471-2334-14-279
92. Anagonou GE, Johnson RC, Sopoh GE, Djotan KG, Barogui YT, Tente BH. Modeling the distribution of Mycobacterium ulcerans infection in Lalo district, Benin; [Modélisation de la distribution de l'infection à Mycobacterium ulcerans dans la commune de Lalo, Bénin]. *Environnement, Risques et Sante*. 2020;19(1):20 – 28. doi:10.1684/ers.2019.1389
93. Govindasamy D, Ford N, Kranzer K. Risk factors, barriers and facilitators for linkage to antiretroviral therapy care: A systematic review. *AIDS*. 2012;26(16):2059 – 2067. doi:10.1097/QAD.0b013e3283578b9b
94. Simmering JE, Cavanaugh JE, Polgreen LA, Polgreen PM. Warmer weather as a risk factor for hospitalisations due to urinary tract infections. *Epidemiol Infect*. 2018;146(3):386 – 393. doi:10.1017/S0950268817002965
95. Peterson RA, Polgreen LA, Sewell DK, Polgreen PM. Warmer Weather as a Risk Factor for Cellulitis: A Population-based Investigation. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;65(7):1167 – 1173. doi:10.1093/cid/cix487
96. Herrera-Lara S, Fernández-Fabrellas E, Cervera-Juan Á, Blanquer-Olivas R. Do Seasonal Changes and Climate Influence the Etiology of Community Acquired Pneumonia?; [¿Influyen la estación y el clima en la etiología de la neumonía adquirida en la comunidad?]. *Arch Bronconeumol*. 2013;49(4):140 – 145. doi:10.1016/j.arbr.2013.02.004
97. Sirisena PDNN, Noordeen F. Evolution of dengue in Sri Lanka-changes in the virus, vector, and climate. *International Journal of Infectious Diseases*. 2014;19(1):6 – 12. doi:10.1016/j.ijid.2013.10.012
98. Herwaldt LA, Marra AR. Legionella: A reemerging pathogen. *Curr Opin Infect Dis*. 2018;31(4):325 – 333. doi:10.1097/QCO.0000000000000468
99. Bornstein N, Marmet D, Surgot M, et al. Exposure to Legionellaceae at a hot spring spa: A prospective clinical and serological study. *Epidemiol Infect*. 1989;102(1):31 – 36. doi:10.1017/S0950268800029654
100. Rossi AM, Coppola A, Lucibello T, et al. Epidemiology of legionella infections: The experience in Campania Region; [Epidemiologia delle infezioni da legionella: L'esperienza in Campania]. *Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio*. 2009;5(SUPPL.):87 – 89. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-77749339125&partnerID=40&md5=b746f42fbf782cd02c7894753fd63733>
101. Yong SFY, Tan SH, Wee J, et al. Molecular detection of Legionella: Moving on from mip. *Front Microbiol*. 2010;1(NOV). doi:10.3389/fmicb.2010.00123

102. Chow JW, Yu VL. Legionella: A major opportunistic pathogen in transplant recipients. *Semin Respir Infect.* 1998;13(2):132 – 139. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0031807830&partnerID=40&md5=c8ec2b9a091c1336f11d4e39340b4acb>
103. Petrovová M. Microbiological findings of legionellae in the manufacture of flat glass: Health risk assessment. *Ceramics - Silikaty.* 2012;56(4):352 – 359. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84874891667&partnerID=40&md5=e28248c2feb60864ca419ba7d8233107>
104. Kirschner AKT. Determination of viable legionellae in engineered water systems: Do we find what we are looking for? *Water Res.* 2016;93:276 – 288. doi:10.1016/j.watres.2016.02.016
105. Chen NT, Chang CW. Rapid quantification of viable legionellae in water and biofilm using ethidium monoazide coupled with real-time quantitative PCR: ORIGINAL ARTICLE. *J Appl Microbiol.* 2010;109(2):623 – 634. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04678.x
106. Henos N, Giuliana F, Leoni E, Quaglio P. Isolation of Legionella pneumophila from water systems; [Isolamento di Legionella pneumophila da sistemi di distribuzione di acqua]. *Igiene Moderna.* 2002;117(1):1 – 7. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-33751207403&partnerID=40&md5=609010e6b8fffe11ee2343c8b5e952d1>
107. Orsini M, Cristino S, Grottola A, Romano-Spica V. Bacteria misagglutination in legionella surveillance programmes. *Journal of Hospital Infection.* 2011;79(2):179 – 180. doi:10.1016/j.jhin.2011.05.021
108. Borella P, Bargellini A, Pergolizzi S, et al. Prevention and control of Legionella infection in the hospital environment; [Prevenzione e controllo dell'infezione da Legionella in ambiente ospedaliero.]. *Ann Ig.* 2000;12(4):287 – 296. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0034230852&partnerID=40&md5=d184ee79f751db5cf77605cc897bd826>
109. Dey R, Mount H, Ensminger AW, Tyrrell GJ, Ward LP, Ashbolt NJ. Isolation of legionella pneumophila by co-culture with Local Ameba, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(11):2104 – 2107. doi:10.3201/eid2511.190522
110. Dorer MS, Kirton D, Bader JS, Isberg RR. RNA interference analysis of Legionella in Drosophila cells: Exploitation of early secretory apparatus dynamics. *PLoS Pathog.* 2006;2(4):315 – 327. doi:10.1371/journal.ppat.0020034
111. Blanchard DK, Stewart WE, Klein TW, Friedman H, Djeu JY. Cytolytic activity of human peripheral blood leukocytes against Legionella pneumophila-infected monocytes: Characterization of the effector cell and augmentation by interleukin 2. *Journal of Immunology.* 1987;139(2):551 – 556. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0023186964&partnerID=40&md5=d37d732cc33f1e0015378ab0acbc1cad>
112. Bozzoni M, Radice L, Frosi A, Vezzoli S, Cuboni A, Vezzoli F. Prevalence of pneumonia due to legionella pneumophila and mycoplasma pneumoniae in a population admitted to a department of internal medicine. *Respiration.* 1995;62(6):331 – 335. doi:10.1159/000196475
113. Girolamini L, Salaris S, Pascale MR, Mazzotta M, Cristino S. Dynamics of Legionella Community Interactions in Response to Temperature and Disinfection Treatment: 7 Years of Investigation. *Microb Ecol.* 2022;83(2):353 – 362. doi:10.1007/s00248-021-01778-9
114. Xi D, Dou Y, Ren W, et al. A gyrB oligonucleotide microarray for the specific detection of pathogenic Legionella and three Legionella pneumophila subsp. *Antonie van*

- Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology.* 2017;110(12):1515 – 1525. doi:10.1007/s10482-017-0903-x
115. Cocuzza CE, Martinelli M, Perdoni F, et al. Antibiotic susceptibility of environmental legionella pneumophila strains isolated in northern Italy. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(17). doi:10.3390/ijerph18179352
 116. Campese C, Bitar D, Jarraud S, et al. Progress in the surveillance and control of Legionella infection in France, 1998-2008. *International Journal of Infectious Diseases.* 2011;15(1):e30–e37. doi:10.1016/j.ijid.2010.09.007
 117. Lück PC, Liebscher B. Detection of Legionella pneumophila in water samples by quantitative culture and an antigen detection assay. *Int J Hyg Environ Health.* 2003;206(3):201 – 204. doi:10.1078/1438-4639-00216
 118. Berdal JE. Legionella pneumonia; [Legionellapneumoni - Viktig differensialdiagnose ved pneumoni etter utenlandsreise Legionella pneumonia]. *Tidsskrift for den Norske Laegeforening.* 2000;120(26):3128 – 3132. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0034735312&partnerID=40&md5=ace35d7b941699e6ed3e147ae92c08a8>
 119. Bertolino G, Marras L, Sanna C, Carrucciu G, Schintu M, Coroneo V. Ten-year retrospective analysis of Legionella diffusion in hospital water systems and its serogroup seasonal variation. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1282:93 – 103. doi:10.1007/5584_2020_484
 120. Ji WT, Hsu BM, Chang TY, et al. Surveillance and evaluation of the infection risk of free-living amoebae and Legionella in different aquatic environments. *Science of the Total Environment.* 2014;499:212 – 219. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.07.116
 121. Schrammel B, Cervero-Aragó S, Dietersdorfer E, et al. Differential development of Legionella sub-populations during short- and long-term starvation. *Water Res.* 2018;141:417 – 427. doi:10.1016/j.watres.2018.04.027
 122. Borella P, Montagna MT, Romano-Spica V, et al. Environmental diffusion of Legionella spp and legionellosis frequency among patients with pneumonia: preliminary results of a multicentric Italian survey; [Diffusione ambientale di Legionella spp e frequenza di legionellosi in pazienti affetti da polmonite: primi risultati di uno studio multicentrico italiano.]. *Ann Ig.* 2003;15(5):493 – 503. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-1542309507&partnerID=40&md5=c36d4afc76e5d6149625c81a67d850c1>
 123. Tao L, Zhu W, Hu BJ, Qu JM, Luo ZQ. Induction of rapid cell death by an environmental isolate of legionella pneumophila in mouse macrophages. *Infect Immun.* 2013;81(9):3077 – 3088. doi:10.1128/IAI.00252-13
 124. Dietersdorfer E, Kirschner A, Schrammel B, et al. Starved viable but non-culturable (VBNC) Legionella strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages. *Water Res.* 2018;141:428 – 438. doi:10.1016/j.watres.2018.01.058
 125. Copenhaver AM, Casson CN, Nguyen HT, et al. Alveolar macrophages and neutrophils are the primary reservoirs for legionella pneumophila and mediate cytosolic surveillance of type IV secretion. *Infect Immun.* 2014;82(10):4325 – 4336. doi:10.1128/IAI.01891-14
 126. Whitfield NN, Byrne BG, Swanson MS. Mouse macrophages are permissive to motile Legionella species that fail to trigger pyroptosis. *Infect Immun.* 2010;78(1):423 – 432. doi:10.1128/IAI.00070-09
 127. Aguilar-Tipacamu G, Carvajal-Gamez BI, García-Rejon J, Machain-Williams C, Mosqueda J. Immuno-molecular prospecting for vector-borne diseases in central Mexico. *Transbound Emerg Dis.* 2020;67(S2):185 – 192. doi:10.1111/tbed.13504

128. Rinaldi M, Geldhof P. Immunologically based control strategies for ostertagiosis in cattle: Where do we stand? *Parasite Immunol.* 2012;34(5):254 – 264. doi:10.1111/j.1365-3024.2011.01313.x
129. Kay C, Wang R, Kirkby M, Man SM. Molecular mechanisms activating the NAIP-NLRC4 inflammasome: Implications in infectious disease, autoinflammation, and cancer. *Immunol Rev.* 2020;297(1):67 – 82. doi:10.1111/imr.12906
130. Culver EL, Travis SPL. How to manage the infectious risk under anti-TNF in inflammatory bowel disease. *Curr Drug Targets.* 2010;11(2):198 – 218. doi:10.2174/138945010790310009
131. Danzetta ML, Bruno R, Sauro F, Savini L, Calistri P. Rift Valley fever transmission dynamics described by compartmental models. *Prev Vet Med.* 2016;134:197 – 210. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.09.007
132. Hanf M, Adenis A, Couppie P, Carme B, Nacher M. HIV-associated histoplasmosis in French Guiana: Recent infection or reactivation? *AIDS.* 2010;24(11):1777 – 1778. doi:10.1097/QAD.0b013e32833999c9
133. Ballif M, Zürcher K, Reid SE, et al. Seasonal variations in tuberculosis diagnosis among HIV-positive individuals in Southern Africa: Analysis of cohort studies at antiretroviral treatment programmes. *BMJ Open.* 2018;8(1). doi:10.1136/bmjopen-2017-017405
134. Kazuma-Matululu T, Nyondo-Mipando AL. “Men Are Scared That Others Will Know and Will Discriminate Against Them So They Would Rather Not Start Treatment.” Perceptions of Heterosexual Men on HIV-Related Stigma in HIV Services in Blantyre, Malawi. *J Int Assoc Provid AIDS Care.* 2021;20. doi:10.1177/23259582211059921
135. Wingo T, Nesil T, Chang SL, Li MD. Interactive Effects of Ethanol and HIV-1 Proteins on Novelty-Seeking Behaviors and Addiction-Related Gene Expression. *Alcohol Clin Exp Res.* 2016;40(10):2102-2113. doi:10.1111/acer.13206
136. Wong HY, Rajasuriar R, Wong PL, Lee YK. “I suppose in our culture, old means no sex”: PLWH and healthcare provider views on factors influencing late HIV testing and diagnosis among older adults in Malaysia. *AIDS Care - Psychological and Socio-Medical Aspects of AIDS/HIV.* 2024;36(9):1310 – 1324. doi:10.1080/09540121.2024.2331220
137. Annesi-Maesano I, Biagioni B, Maesano C, D’Amato G, Cecchi L. *Unraveling the Exposome in Direct and Indirect Respiratory Effects of Climate Change.* Vol 6.; 2021. doi:10.1016/B978-0-08-102723-3.00269-9
138. Jernigan DB, Hofmann J, Cetron MS, et al. Outbreak of Legionnaires’ disease among cruise ship passengers exposed to a contaminated whirlpool spa. *Lancet.* 1996;347(9000):494 – 499. doi:10.1016/S0140-6736(96)91137-X
139. Di X, Li S, Ma B, et al. How climate, landscape, and economic changes increase the exposure of *Echinococcus* Spp. *BMC Public Health.* 2022;22(1). doi:10.1186/s12889-022-14803-4
140. Brodhun B, Buchholz U. Epidemiology of Legionnaires’ disease in Germany; [Epidemiologie der Legionärskrankheit in Deutschland]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2011;54(6):680 – 687. doi:10.1007/s00103-011-1280-7
141. Billo NE, Hohl PE, Winteler S. Epidemiology of Legionnaire’s disease in Switzerland in 1988; [EPIDEMIOLOGIE DER LEGIONARSKRANKHEIT IN DER SCHWEIZ IM JAHRE 1988]. *Schweiz Med Wochenschr.* 1989;119(51):1859 – 1861. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0024854626&partnerID=40&md5=082fee323061e5cad7084dba999a0191>
142. ALMEIDA DQ, SILVA T, RODRIGUES V, et al. Surto de doença dos legionários na costa norte de portugal durante a pandemia da covid-19; [Outbreak of Legionnaires’

- Disease in the Northern Portuguese Coast during the COVID-19 Pandemic]. *Acta Med Port.* 2021;34(13). doi:10.20344/AMP.15823
143. Tossa P, Deloge-Abarkan M, Zmirou-Navier D, Hartemann P, Mathieu L. Pontiac fever: An operational definition for epidemiological studies. *BMC Public Health.* 2006;6. doi:10.1186/1471-2458-6-112
 144. Benin AL, Benson RF, Arnold KE, et al. An outbreak of travel-associated legionnaires disease and pontiac fever: The need for enhanced surveillance of travel-associated legionellosis in the United States. *Journal of Infectious Diseases.* 2002;185(2):237 – 243. doi:10.1086/338060
 145. Pleischl S, Engelhart S, Bailly E, Exner M. Prevention and control of legionnaires' disease: Clinical and legal aspects; [Klinische und rechtliche aspekten der prävention und kontrolle von legionella-infektionen]. *Umweltmedizin in Forschung und Praxis.* 2001;6(4):193 – 201. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0034844115&partnerID=40&md5=6d18624f446f2e374fee17ce8a02a333>
 146. McDonough EA, Metzgar D, Hansen CJ, Myers CA, Russell KL. A cluster of Legionella-associated pneumonia cases in a population of military recruits. *J Clin Microbiol.* 2007;45(6):2075 – 2077. doi:10.1128/JCM.02359-06
 147. Winn WC. Legionella and the clinical microbiologist. *Infect Dis Clin North Am.* 1993;7(2):377 – 392. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0027284505&partnerID=40&md5=6706e442e631443d5219cfd2e996cb1c>
 148. Harrison TG, Doshi N, Fry NK, Joseph CA. Comparison of clinical and environmental isolates of Legionella pneumophila obtained in the UK over 19years. *Clinical Microbiology and Infection.* 2007;13(1):78 – 85. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01558.x
 149. Lück PC, Helbig JH, Schuppler M. Epidemiology and laboratory diagnosis of Legionella infections. *LaboratoriumsMedizin.* 2002;26(3-4):174 – 182. doi:10.1046/j.1439-0477.2002.02038.x
 150. Cameron RL, Pollock KGJ, Lindsay DSJ, Anderson E. Comparison of legionella longbeachae and Legionella pneumophila cases in Scotland; implications for diagnosis, treatment and public health response. *J Med Microbiol.* 2016;65(2):142 – 146. doi:10.1099/jmm.0.000215
 151. Al-Naser YA. The impact of artificial intelligence on radiography as a profession: A narrative review. *J Med Imaging Radiat Sci.* 2023;54(1):162 – 166. doi:10.1016/j.jmir.2022.10.196
 152. Crumlish M. *Bacterial Diagnosis and Control in Fish and Shellfish.*; 2017. doi:10.1002/9781119152125.ch2
 153. Suminda GGD, Bhandari S, Won Y, et al. High-throughput sequencing technologies in the detection of livestock pathogens, diagnosis, and zoonotic surveillance. *Comput Struct Biotechnol J.* 2022;20:5378 – 5392. doi:10.1016/j.csbj.2022.09.028
 154. Lecollinet PS, Beck C, Zientara S. West Nile virus: Diagnosis, surveillance and epidemiology in Europe; [Le virus west nile: Diagnostic, Surveillance et évolution épidémiologique en Europe]. *Bull Acad Vet Fr.* 2012;165(1):35 – 43. doi:10.4267/2042/48114
 155. Tahamtan Y, Amrabadi O, Shahryari R. Identification of Pasteurella multocida and molecular diagnosis of haemorrhagic septicaemia in Iranian camels. *Rev Med Vet (Toulouse).* 2016;167(5-6):126 – 132. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84971015010&partnerID=40&md5=0e776420a747124dcbea56dc88a996e9>
 156. Strickland SJ, Scott HM, Libal MC, Roussel Jr. AJ, Jordan ER. Effects of seasonal climatic conditions on the diagnosis of Mycobacterium avium subspecies

- paratuberculosis in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2005;88(7):2432 – 2440. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72921-0
157. Cristian MF, Mirela C, Mihaela S, Liviu B, Emil C. Indicators for early diagnosis and quantification of biocenotic stress on some fruit species grown in the superintensive system. *Fruit Growing Research.* 2019;35:24 – 38. doi:10.33045/fgr.v35.2019.05
 158. Jamil M, Rehman H, Saqlain Zaheer M, et al. The use of Multispectral Radio-Meter (MSR5) data for wheat crop genotypes identification using machine learning models. *Sci Rep.* 2023;13(1). doi:10.1038/s41598-023-46957-5
 159. Razavi M, Kristiansson E, Flach CF, Larsson DGJ. The association between insertion sequences and antibiotic resistance genes. *mSphere.* 2020;5(5). doi:10.1128/mSphere.00418-20
 160. Gaur L, Chandola I, Negi N, Rawat P. Microbial profile and antibiotic resistance pattern of water supply in a tertiary care hospital of Uttarakhand. *Iran J Microbiol.* 2023;15(2):225 – 235. doi:10.18502/ijm.v15i2.12474
 161. Yang Q, Zhang M, Tu Z, et al. Department-specific patterns of bacterial communities and antibiotic resistance in hospital indoor environments. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2024;108(1). doi:10.1007/s00253-024-13326-9
 162. Ternak G, Almasi I, Rakoczi E. Hospital antibiotic management in Hungary - Results of the ABS maturity survey of the ABS International group. *Wien Klin Wochenschr.* 2008;120(9-10):299 – 302. doi:10.1007/s00508-008-0972-y
 163. Minetti C, Barton R, Farley C, Spiller OB, Rodrigues R, Gonçalves P. Antimicrobial susceptibility testing reveals reduced susceptibility to azithromycin and other antibiotics in *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from Portugal. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2024;43(7):1297 – 1308. doi:10.1007/s10096-024-04789-9
 164. Guyot S, Goy JJ, Gersbach P, Jatton K, Blanc DS, Zanetti G. *Legionella pneumophila* aortitis in a heart transplant recipient. *Transplant Infectious Disease.* 2007;9(1):58 – 59. doi:10.1111/j.1399-3062.2006.00174.x
 165. Leask R, Bath GF. Observations and perceptions of veterinarians and farmers on heartwater distribution, occurrence and associated factors in South Africa. *J S Afr Vet Assoc.* 2020;91. doi:10.4102/jsava.v91i0.1763
 166. Wei SH, Chou P, Tseng LR, et al. Nosocomial Neonatal Legionellosis Associated with Water In Infant Formula, Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(11):1921 – 1924. doi:10.3201/eid2011.140542
 167. Yu VL. Legionella surveillance: Political and social implications - A little knowledge is a dangerous thing. *Journal of Infectious Diseases.* 2002;185(2):259 – 261. doi:10.1086/338265
 168. Kee TG, Ng DLK, Yap J, Ma S, Eng EO. Surveillance, prevention, and control of legionellosis in a tropical city-state. *Am J Infect Control.* 2005;33(5):286 – 291. doi:10.1016/j.ajic.2004.12.001
 169. Pathogen surveillance. *New Zealand Public Health Surveillance Report.* 2005;3(2):7 – 8. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-27744576645&partnerID=40&md5=08ad89970f75cfb706e5949d13760958>
 170. Radziminski C, White P. Cooling tower Legionella pneumophila surveillance results: Vancouver, Canada, 2021. *J Water Health.* 2023;21(3):313 – 328. doi:10.2166/wh.2023.154
 171. Qin T, Ren H, Chen D, et al. National surveillance of legionnaires' disease, China, 2014-2016. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(6):1218 – 1219. doi:10.3201/eid2506.171431
 172. Brunello A, Civilini M, De Martin S, et al. Machine learning-assisted environmental surveillance of Legionella: A retrospective observational study in Friuli-Venezia Giulia

- region of Italy in the period 2002–2019. *Inform Med Unlocked*. 2022;28. doi:10.1016/j.imu.2021.100803
173. Bianchi A, Pregliasco FE, Consonni M, Tesauro M. Genotypic diversity of *Legionella pneumophila* in environmental and clinical strains assessed by Sequence-Based Typing, in association with retrospective clinical surveillance in Northern Italy. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2016;23(2):248 – 253. doi:10.5604/12321966.1203885
 174. Torre I, Alfano R, Borriello T, et al. Environmental surveillance and in vitro activity of antimicrobial agents against *Legionella pneumophila* isolated from hospital water systems in Campania, South Italy: a 5-year study. *Environ Res*. 2018;164:574 – 579. doi:10.1016/j.envres.2018.02.030
 175. García-Cela ME, Marín S, Reyes M, Sanchis V, Ramos AJ. *Conidia* survival of *Aspergillus* section *Nigri*, *Flavi* and *Circumdati* under UV-A and UV-B radiation with cycling temperature/light regime. *J Sci Food Agric*. 2016;96(6):2249 – 2256. doi:10.1002/jsfa.7343
 176. Girolamini L, Dormi A, Pellati T, et al. Advances in legionella control by a new formulation of hydrogen peroxide and silver salts in a hospital hot water network. *Pathogens*. 2019;8(4). doi:10.3390/pathogens8040209
 177. Hooshyar M, Wagner CE, Baker RE, Metcalf CJE, Grenfell BT, Porporato A. Cyclic epidemics and extreme outbreaks induced by hydro-climatic variability and memory: Cyclic epidemics and extreme outbreaks induced by hydro-climatic variability and memory. *J R Soc Interface*. 2020;17(171). doi:10.1098/rsif.2020.0521
 178. Aparicio-Effen M, Arana I, Aparicio J, et al. Introducing Hydro-Climatic Extremes and Human Impacts in Bolivia, Paraguay and Uruguay. *Climate Change Management*. Published online 2016:449 – 473. doi:10.1007/978-3-319-24660-4_26
 179. Uejio CK, Kemp A, Comrie AC. Climatic controls on west nile virus and sindbis virus transmission and outbreaks in South Africa. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2012;12(2):117 – 125. doi:10.1089/vbz.2011.0655
 180. Duda S, Kandiah S, Stout JE, et al. Evaluation of a new monochloramine generation system for controlling *Legionella* in building hot water systems. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014;35(11):1356 – 1363. doi:10.1086/678418
 181. Borella P, Bargellini A, Marchegiano P, Vecchi E, Marchesi I. Hospital-acquired *Legionella* infections: An update on the procedures for controlling environmental contamination. *Ann Ig*. 2016;28(2):98 – 108. doi:10.7416/ai.2016.2088
 182. Hancock PA, Rehman Y, Hall IM, et al. Strategies for Controlling Non-Transmissible Infection Outbreaks Using a Large Human Movement Data Set. *PLoS Comput Biol*. 2014;10(9). doi:10.1371/journal.pcbi.1003809