

# Climatizzazione di ambienti *indoor* e rischio biologico

P. Anzidei<sup>1</sup>, R. Caruso<sup>2</sup>, F. Cipolloni<sup>3</sup>, F. Marracino<sup>3</sup>, F. Venanzetti<sup>1</sup>, G. Ziragachi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Inail, Direzione Generale - Consulenza Tecnica Accertamento Rischi e Prevenzione

<sup>2</sup>Associazione Italiana Igienisti Sistemi Aeraulici

<sup>3</sup>Inail, Direzione Generale - Consulenza Statistica Attuariale

## Introduzione

Il termine rischio intuitivamente richiama l'attenzione su una situazione pericolosa, il cui accadimento potrebbe determinare un danno. Quando il rischio riguarda l'esposizione ad agenti biologici patogeni o potenzialmente tali, la percezione del pericolo spesso non è immediata.

La qualità dell'aria che respiriamo negli ambienti *indoor* come le abitazioni, gli uffici o gli ospedali, dal punto di vista chimico, fisico e biologico è strettamente correlata alla qualità dell'aria esterna, al tipo di ambiente considerato, alle persone eventualmente presenti e all'efficienza dei sistemi di aerazione. L'uomo, gli animali, gli arredi, la polvere e gli impianti di condizionamento, se non correttamente gestiti, sono sicuramente tra le principali fonti di contaminazione microbiologica.

Le patologie legate alla qualità dell'aria *indoor* vengono comunemente raggruppate in due distinte tipologie, quelle note come Sindrome dell'Edificio Malato (Sick Building Syndrome, SBS) e quelle definite come Malattie Correlate all'Edificio (Building Related Illness, BRI). Entrambe dipendono strettamente dal microclima e dall'esposizione agli agenti chimici, fisici e biologici eventualmente presenti e si manifestano in seguito alla permanenza in un dato ambiente; nel primo caso i sintomi regrediscono e spesso scompaiono con l'allontanamento da quell'ambiente, nel secondo no. La SBS presenta sintomi aspecifici ma ripetitivi e non correlati a uno specifico agente, quali: irritazione degli occhi, delle vie aeree e della cute, tosse, senso di costrizione toracica, nausea, torpore, cefalea ecc; ma, come ricordato anche dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, nelle recenti Linee Guida per la qualità dell'aria *indoor* (WHO guidelines for indoor air quality - Dampness and Mould, 2009), nel caso degli agenti biologici, non è possibile correlare singole specie di microrganismi a eventuali effetti avversi sulla salute. La difficoltà nasce dalla simultanea esposizione a molti agenti differenti, dalla complessità di una stima accurata dell'esposizione e dalla varietà dei sintomi e degli effetti.

Al contrario della SBS, le BRI sono patologie ben precise, come la **legionellosi**, l'alveolite allergica e altre comuni allergie, per le quali l'agente causale può essere identificato. Gli agenti biologici aerodispersi negli ambienti confinati, in grado di causare patologie nell'uomo e considerati, quindi, un rischio per la salute, comprendono i batteri (i.e. Stafilococchi e gram negativi), i funghi (i.e. *Cladosporium*, *Penicilium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus*) e i loro residui (endotossine, micotossine), i peli, le spore, i virus (i.e. Rhinovirus e virus influenzali), gli acari, e i pollini.

Tra i batteri patogeni è particolarmente rilevante l'eventuale presenza della legionella, un bacillo aerobio gram negativo, ubiquitario negli ecosistemi acquatici naturali, dove è stata riscontrata nel 40% degli ambienti indagati con metodi colturali e nell'80% di quelli studiati tramite PCR. La legionella, nel caso trovi condizioni favorevoli alla propria sopravvivenza, è in grado di passare dagli ambienti naturali a quelli artificiali raggiungendo picchi di crescita a temperature comprese tra i 28 e i 50 °C (Bentham, 2000; Turetgen *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 1992). Sono state descritte più di 50 specie (71 sierotipi), metà delle quali potenziali patogeni per l'uomo, anche se circa il 90% dei casi di infezione registrati sono riferibili alla specie *L. pneumophila* (principalmente i sierogruppi 1 e 6).

La frequenza d'infezione e la reale patogenicità della legionella e dei diversi sierogruppi, non è ben conosciuta oltre che per l'effettiva difficoltà diagnostica, anche per la mancata identificazione delle specie e dei sierogruppi meno frequentemente correlati alle patologie notificate. La legionellosi, infatti, non è radiograficamente distinguibile da una comune polmonite e per arrivare alla conferma della diagnosi è necessario eseguire alcuni test molto specifici come la ricerca dell'antigene solubile urinario, l'analisi sierologica e l'isolamento del microrganismo da fluidi biologici infetti (espettorato).

Negli ultimi anni, considerata la rilevanza della questione che rientra tra le problematiche di sanità pubblica, l'attenzione verso il problema delle legionellosi è andata progressivamente aumentando.

È stato stimato che la legionella sia l'agente eziologico del 2-15% delle polmoniti comunitarie e del 15-20% delle polmoniti nosocomiali (Fields *et al.* 2002, Roig *et al.* 2003). In Italia, il gruppo multicentrico di studio sulla Legionellosi ha verificato che 5000 polmoniti monitorate, il 3,8% era causato da legionella (Borella *et al.* 2004).

Il presente studio ha lo scopo di valutare i livelli di contaminazione microbiologica e l'eventuale presenza di legionella in diverse tipologie d'impianti di aerazione e climatizzazione di ambienti *indoor*, distribuiti su tutto il territorio nazionale.

Grazie alla collaborazione di alcune ditte, socie dell'Associazione Italiana Igienisti Sistemi Aeraulici (AIISA), che si occupano regolarmente di manutenzione e sanificazione degli impianti, sono stati analizzati i dati relativi ai campionamenti microbiologici effettuati negli anni 2004-2008, in occasione di alcuni interventi di manutenzione e sanificazione.

## La Legionella

Le legionelle sono parassiti intracellulari naturali dei protozoi ma possono usare meccanismi simili a quelli utilizzati per colonizzare le amebe per moltiplicarsi all'interno dei macrofagi umani come patogeni opportunisti. La penetrazione avviene per fagocitosi e l'unico fagosoma che ne deriva si associa al reticolo endoplasmatico rugoso, dove il batterio si moltiplica. Al termine del ciclo infettivo la cellula ospite muore: nei macrofagi e nelle cellule epiteliali degli alveoli polmonari la morte avviene per apoptosi, mentre nelle amebe per necrosi.

Le legionelle hanno bisogno di una particolare combinazione di nutrienti che trovano nell'ambiente intracellulare dei loro ospiti (amebe, protozoi ciliati e muffe acquatiche), ma sono in grado di sopravvivere associate ai biofilm che si sviluppano sulle superfici, preferibilmente porose, di ambienti acquatici naturali e artificiali.

Il biofilm è costituito da una variegata comunità di microrganismi e dalle sostanze extracellulari da essi prodotte, al suo interno le legionelle trovano riparo e nutrimento, anche se in assenza di amebe non sono in grado di moltiplicarsi.

Il biofilm, non solo funge da substrato per lo sviluppo della comunità microbica ma, garantendo il mantenimento di condizioni ambientali costanti, protegge i microrganismi dalle fluttuazioni chimico-fisiche della fase acquosa sovrastante e dagli eventuali trattamenti con biocidi.

Si conosce ancora poco dei fattori che contribuiscono alla sopravvivenza e alla proliferazione della Legionella, in particolare sono disponibili poche informazioni sulla diversità microbica dei sistemi che contamina e delle condizioni che influenzano la sua patogenicità.

Per una migliore gestione del rischio biologico derivante dalla presenza di legionella, sarebbe utile approfondire lo studio delle dinamiche delle diverse componenti microbiologiche durante la proliferazione delle specie patogene. Infatti, alcuni studi hanno evidenziato che la sopravvivenza e la proliferazione della Legionella all'interno dei biofilm è influenzata dalla presenza di batteri eterotrofi acquatici che sembrano avere un'azione inibente grazie alla produzione di batteriocine (Messi *et al.* 2003; Kuiper *et al.* 2004; Messi *et al.*, 2005), mentre altri lavori rilevano che l'infettività nei confronti dei macrofagi umani sembra aumentata se il microrganismo si è precedentemente replicato all'interno di amebe (Cirillo *et al.* 1994).

La contaminazione da legionella acquista particolare rilevanza per la salute qualora interessi gli impianti idrici e di condizionamento dell'aria o più genericamente, ambienti acquatici artificiali da cui possa propagarsi nell'ambiente attraverso aerosolizzazione dell'acqua.

La sua capacità di dare infezione e malattia si manifesta, infatti, solo se inalata con piccolissime particelle d'acqua in grado di raggiungere gli alveoli polmonari.

La patologia che può derivare dall'infezione da legionella è nota come legionellosi, una malattia emersa nella seconda metà del ventesimo secolo principalmente a causa dell'antropizzazione dell'ambiente naturale. Infatti, le legionelle nel loro ecosistema naturale non sarebbero causa di patologie, come dimostra il fatto che gli ambienti d'acqua dolce naturali, ad oggi, non sono mai stati correlati a casi di infezione.

La maggior parte dei casi, invece, può essere correlata agli ambienti acquatici artificiali dove spesso la temperatura dell'acqua è maggiore di quella ambiente; questo aumento può causare l'alterazione del rapporto tra protozoi e batteri e una rapida moltiplicazione delle legionelle.

Inoltre, come precedentemente accennato, la diagnosi certa della patologia è piuttosto laboriosa e non è possibile distinguere la polmonite dovuta alla Legionella (malattia del legionario) da una qualsiasi altra polmonite batterica, senza considerare che a volte il decorso appare simile nella sintomatologia a una comune influenza (febbre di Pontiac) o addirittura asintomatico.

## La contaminazione microbiologica negli impianti di aerazione

In un impianto aeraulico le aree a rischio di contaminazione da legionella sono quelle in cui è presente l'acqua, in particolare le sezioni di umidificazione, i sifoni di drenaggio all'interno delle Unità di Trattamento dell'Aria (UTA) e le torri di raffreddamento.

In particolare queste ultime sono considerate siti ad alto rischio poiché la presenza di biofilm e l'elevata temperatura dell'acqua al loro interno possono favorire lo sviluppo di importanti concentrazioni di *L. pneumophila*, mentre, contemporaneamente, il meccanismo stesso di funzionamento comporta la diffusione del microrganismo attraverso l'aerosol.

Nell'ambito degli studi sulla contaminazione delle acque delle torri, *L. pneumophila* rappresenta sicuramente il patogeno più ricercato ma non è certamente l'unico agente biologico, potenzialmente dannoso per la salute umana, in grado di colonizzare tali ambienti. Molti altri microrganismi patogeni come per esempio *Aeromonas* spp (Mackerness *et al.*, 1991), *Pseudomonas aeruginosa* (Emtiazi *et al.*, 2004; Grobe *et al.*, 1995; Searcy *et al.*, 2006), *Mycobacterium* spp. (Emtiazi *et al.*, 2004; Falkinham, 2002; Schulze-Robbecke *et al.*, 1989), *E.coli* (Mackerness *et al.*, 1991), *Cryptosporidium* spp (Searcy *et al.*, 2006; Angles *et al.*, 2007), *Acanthamoeba* spp (Storey *et al.*, 2007) e alcuni enterovirus (Helmi *et al.*, 2008; Storey e Ashbolt, 2001) possono vivere in associazione ai biofilm acquatici trovandovi riparo e nutrimento e alcuni di essi sono risultati responsabili di casi d'infezioni nosocomiali.

Molte indagini hanno rilevato la presenza di *L. pneumophila* prevalentemente durante la stagione estiva, con concentrazioni variabili più basse in maggio e giugno e poi sempre più elevate fino a raggiungere il picco nel mese di agosto. La distribuzione temporale della concentrazione di *L. pneumophila* è congruente con i picchi d'incidenza dei casi di legionellosi in Europa che si manifestano principalmente in estate e autunno, in Italia agosto e settembre (dati ISS). Il fenomeno è facilmente spiegabile se si considera la maggior velocità di replicazione della Legionella durante la stagione calda, grazie all'aumento della temperatura dell'acqua e al maggior utilizzo delle torri di raffreddamento per gli impianti di climatizzazione. Quando però si considerano i soli casi nosocomiali, questi sono distribuiti su tutto l'arco dell'anno senza differenze stagionali. La causa è la natura opportunistica dell'infezione, che annovera tra i fattori di rischio che predispongono alla patologia: l'età (più del 70% dei casi ha più di 50 anni), l'immunodeficienza, il sesso (i maschi presentano un indice di rischio maggiore delle donne), le malattie croniche, il tabagismo, il cancro e il diabete.

Uno studio del 2008 (Wery *et al.*) ha evidenziato la capacità di Legionella di resistere alle procedure di sanificazione, infatti, in una torre di raffreddamento i valori di carica microbica, scesi sotto il limite di rilevabilità del sistema (PCR quantitativa) in seguito alle operazioni di pulizia, dopo pochi giorni erano nuovamente aumentati per rimanere stabili nelle settimane successive. L'eventuale presenza di biofilm, che è piuttosto resistente alle procedure di sanificazione (biocidi e clorazione) spiegherebbe

il fallimento nella eradicazione del patogeno; la comprensione del rapporto tra biofilm e legionella è, quindi, particolarmente rilevante allo scopo di migliorare i procedimenti di pulizia e disinfezione che ancora non garantiscono l'eliminazione del microrganismo. Nello stesso lavoro era monitorato l'andamento della concentrazione della specie *L. pneumophila*, il quale sembra variare indipendentemente dalla concentrazione totale delle legionelle. Questo rafforza la convinzione che il rischio non possa essere valutato semplicemente testando sporadicamente la presenza di *Legionella* spp., infatti, pur rimanendo stabile la concentrazione di legionelle totali, la concentrazione di *L. pneumophila* aumentava notevolmente in certi periodi dell'anno, dimostrando che l'aumento di *L. pneumophila* avveniva a discapito di altre specie dello stesso genere. Le cause ipotizzabili potrebbero essere: forme di competizione ecologica tra specie diverse, differenti temperature di crescita, presenza di batteri eterotrofi inibenti o cambiamenti nelle popolazioni di protozoi. Non erano stati, comunque, rilevati cambiamenti nella struttura della popolazione microbica pur avendo verificato che la crescita della *L. pneumophila* è possibile solo in presenza di un elevato indice di diversità specifica. Per tenere sotto controllo il rischio di esposizione a legionella, è importante, quindi, conoscere approfonditamente la composizione della comunità microbica all'interno delle torri e quali microrganismi giochino un ruolo nella proliferazione delle specie patogene.

Alcuni fattori sono particolarmente importanti per lo sviluppo delle legionelle, tra questi la composizione in minerali dell'acqua, la temperatura e la capacità dei materiali presenti di fungere da substrato per il biofilm. Un modello di una torre di raffreddamento riprodotto in laboratorio è stato utilizzato per verificare quali materiali favoriscano la formazione del biofilm e, conseguentemente, lo sviluppo delle legionelle (Turetgen e Cotuk 2007). Testati diversi materiali (rame, acciaio inossidabile, acciaio galvanizzato, cloruro di polivinile, polietilene e polipropilene), le conte più basse di *L. pneumophila* sono risultate quelle relative ai substrati costituiti da polimeri, mentre i batteri sembravano accumularsi di più e più rapidamente sulle superfici di acciaio galvanizzato, probabilmente perché questo materiale ha una morfologia di superficie tale da permettere una più facile adesione del biofilm. Il 30-60% delle torri esaminate per Legionella, risultano contaminate (Bentham, 2000; Garbe *et al.*, 1985; Yamamoto *et al.*, 1992), tra queste anche torri apparentemente "ben mantenute" (Turetgen *et al.*, 2005).

Malgrado solo i casi di legionellosi siano stati direttamente correlati alla contaminazione dell'acqua nelle torri (Fiore *et al.*, 1998; Leoni *et al.*, 2005), come già accennato, anche altri microrganismi patogeni per l'uomo: protozoi, batteri e virus, possono colonizzare questi ambienti.

Per quanto riguarda i protozoi (soprattutto Amebe, Ciliati e Flagellati) è bene ricordare, oltre alla patogenicità intrinseca di alcune specie, il ruolo che queste ricoprono come serbatoi per la moltiplicazione di batteri patogeni (tra cui proprio *L. pneumophila*) e la loro propagazione nell'ambiente (Valster *et al.* 2009). Tra le amebe frequentemente rinvenute nei biofilm, i generi *Acanthameba* (agenti eziologici di cheratite, encefalite granulomatosa, acantamebiasi cutanea) e *Negleria* (agenti eziologici della meningoencefalite e di malattie a carico dell'apparato polmonare) comprendono alcune specie che fungono da ospiti per le legionelle. Anche altri microrganismi potenzialmente patogeni sono stati rinvenuti in associazione ai protozoi presenti nelle acque delle torri; tra questi ricordiamo i generi *Pseudomonas spp*, *Xanthomonas*, *Pantoea* e *Serratia*. Inoltre, nel corso degli ultimi anni sono state isolate anche cellule di Micobatteri non tubercolari (NTM), considerati patogeni riemergenti. Alcune specie vivono in stretta associazione con le amebe, riuscendo così a resistere ai trattamenti di clorazione delle acque, ma il ruolo effettivo delle torri nella propagazione ambientale di micobatteri patogeni per l'uomo deve essere ancora chiarito (Pagnier *et al.*, 2009).

I trattamenti chimici, come abbiamo visto, riducono la concentrazione delle singole specie e la carica totale di legionella ma, in presenza di biofilm e amebe che offrono protezione ai batteri, hanno un effetto assolutamente circoscritto al periodo di trattamento. Il disinfettante generalmente utilizzato per il controllo microbico delle acque è il cloro, ma le monocloroammine, oltre a essere meno corrosive del cloro libero, penetrano più efficacemente all'interno del biofilm (Campos *et al.*, 2003; Turetgen *et al.*, 2004). Inoltre, queste formano meno trihalometani, considerati cancerogeni, in seguito alle reazioni chimiche con i substrati organici (Turetgen e Cotuk 2006).

## Metodi

I dati relativi alle misure di contaminazione microbica utilizzati in questo studio, sono stati forniti su base volontaria da alcune ditte operanti nel settore della manutenzione degli impianti aereali afferenti all'AISA. Le ditte hanno fornito le informazioni a loro disposizione relative ai monitoraggi effettuati dal 2004 al 2008 in 107 impianti aereali, mediante un questionario in cui si chiedeva la tipologia dell'impianto della struttura monitorata, il contesto ambientale (urbano, industriale ecc), la matrice campionata (polvere, superficie, aria, acqua), le cariche microbiche rilevate e l'eventuale analisi per la ricerca di legionella. I parametri microbiologici rilevati sono: la carica batterica totale a 30 °C, la carica batterica mesofila e la carica fungina totale, valutate come numero di Unità

Formanti Colonia. Inoltre, per 77 UTA e 33 torri di raffreddamento sono stati forniti i dati relativi alla ricerca della *Legionella spp* e per 10 UTA e 5 torri anche le rilevazioni di *L. pneumophila*. Il questionario chiedeva, inoltre, di specificare se negli ultimi 5 anni si fossero verificati casi di legionellosi correlabili agli impianti monitorati. Un totale di 17 casi è stato riportato per 9 siti. Data la modalità di reperimento delle informazioni, raccolte su base volontaria e a posteriori, è possibile che il numero di casi emersi da questa indagine sia una sottostima del numero reale.

## Risultati

Il grafico 1 rappresenta la distribuzione sul territorio degli impianti studiati, 107 in totale, nel quale appare evidente una disomogenea distribuzione tra nord e sud della penisola. La tipologia degli ambienti studiati è riportata nel grafico 2. I dati analizzati si riferiscono prevalentemente a impianti di edifici per uffici (33% dei siti) e di strutture sanitarie (25% dei siti). Il restante 42% è rappresentato da banche, industrie, navi passeggeri e centri commerciali. La maggior parte degli impianti studiati è del tipo a tutt'aria (43%), seguiti dal tipo ad aria primaria (38%), tutt'aria e fancoils (3%), nei casi rimanenti l'informazione non è stata fornita.

Il contesto prevalente è di tipo urbano.

La ricerca di *Legionella spp* è stata effettuata in 77 dei 107 siti monitorati ed è risultata positiva in 13 casi (8 UTA e 5 torri di raffreddamento). I sierotipi più frequentemente rilevati sono stati il 2 e il 14 seguiti dal 4 e il 9, anche negli impianti per i quali nella scheda erano riportati casi di legionellosi, per i quali però, mancano informazioni circa l'esatta eziologia della patologia.

Grafico 1 Distribuzione territoriale degli impianti analizzati

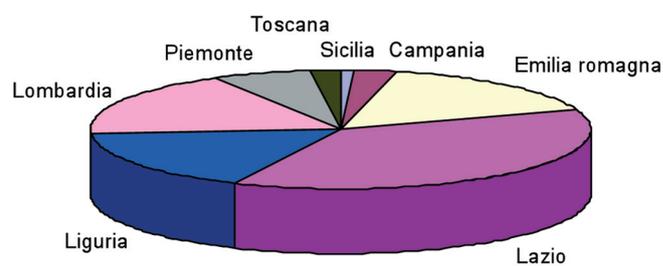
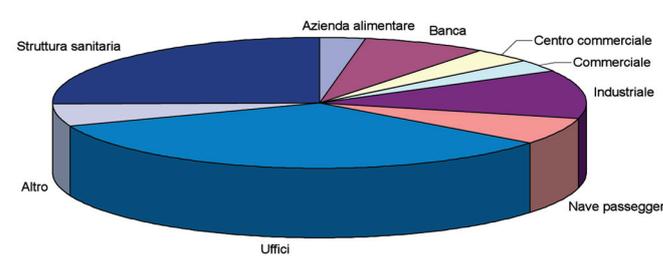


Grafico 2 Tipologia degli ambienti analizzati



### Analisi statistica dei dati

L'analisi statistica dei dati raccolti dalle aziende associate all'AIISA è stato innanzitutto mirato ad accertare se la tipologia di impianto possa influenzare la qualità dell'aria degli ambienti di lavoro serviti. Gli elementi analizzati sono stati: carica batterica totale e/o carica micetica totale. In questi casi si ricorre spesso a tecniche di analisi multivariata, in quanto consentono di evincere dai dati informazioni che non si palesano in via immediata e che comunque, è difficile desumere dai consueti parametri descrittivi o da un approccio inferenziale univariato.

Si è proceduto a un approccio esplorativo di tipo classificativo che desse la misura della validità di questo tipo di analisi statistica rispetto alla specificità dei campionamenti effettuati in relazione alla matrice prelevata (aria, acqua, polvere) e al tipo di impianto. Nel caso specifico, avendo a che fare anche con variabili di tipo categoriale, è stato necessario implementare un modello di *cluster analysis two steps* che misura la similarità di due osservazioni in base alla funzione di verosimiglianza.

Le operazioni di *clustering* sono state ovviamente condotte separatamente a seconda della matrice campionata.

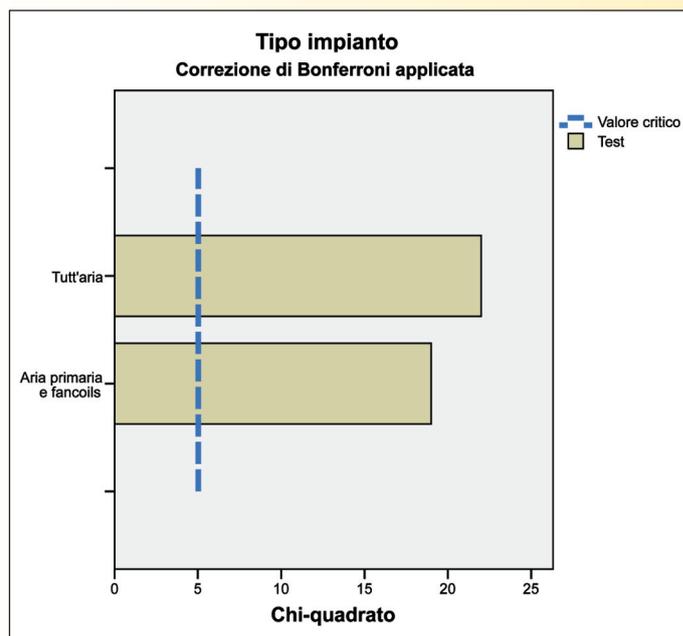
Le operazioni di *clustering* sono state incentrate sulle seguenti variabili:

- Il tipo di impianto (tutt'aria, aria primaria)
- Carica batterica mesofila e/o psicrofila
- Carica micetica

Il risultato, a prescindere che si considerasse il campionamento di aria, acqua o superficie è stato univoco, ossia ha evidenziato che la variabile "tipo impianto" è fondamentale per la costituzione dei *cluster* (Figura 1) e che la loro distanza è fortemente influenzata dalle misurazioni effettuate nei diversi campionamenti. L'analisi è stata condizionata dalla numerosità delle rilevazioni e dal fatto che i dati non derivavano da un piano di monitoraggio elaborato precedentemente alla fase di campionamento, ma dalla fornitura a posteriori dei dati raccolti. Comunque, anche considerando l'inevitabile disomogeneità delle rilevazioni, l'evidenza emersa dalle analisi condotte è che in presenza di impianti a "tutt'aria" le cariche batteriche sono significativamente più basse di quelle rilevate negli altri impianti. In particolare queste evidenze sono emerse in maniera decisa nel caso dei campionamenti d'aria.

### Discussione

Lo studio condotto ha fatto emergere diverse criticità che offrono alcuni spunti di riflessione sulla problematica della qualità dell'aria indoor. Una prima osservazione riguarda la distribuzione sul territorio nazionale dei siti monitorati, che appare congruente con quella dei casi di



legionellosi notificati e registrati nei data base dell'Istituto Superiore di Sanità. Questi, infatti, come risulta dal rapporto annuale sulla legionellosi in Italia del 2007 (ISS), sono molto più numerosi al centro-nord con il 75% dei casi notificati da sole sei regioni. Negli ultimi anni questo squilibrio è rimasto confermato nonostante l'ultimo decennio abbia registrato un generale aumento della notifica dei casi di legionellosi, legato probabilmente a una maggiore sensibilità verso il problema e non a un reale incremento della frequenza della patologia. I *Centers for disease Control* (CdC) americani stimano che solo il 2-10% dei casi di legionellosi vengano notificati e che solo il 5% delle persone esposte a legionella, in seguito all'infezione manifesti polmonite; mentre, per il 90% degli esposti, l'infezione esiterebbe nella febbre di Pontiac. In Italia, secondo i dati dell'ISS, sono notificati 1,5 casi ogni 100.000 abitanti; solo in Francia, in Spagna e a Malta si registrano incidenze più elevate (rispettivamente 2,1, 2,3 e 4,2 casi per 100.000 abitanti, Annual Epidemiological report on communicable diseases 2009 dell'European Centre for Disease Prevention and Control).

L'analisi statistica relativa alla contaminazione microbica degli impianti, ha evidenziato che a prescindere dalla matrice analizzata (polvere, aria e acqua), i dati si raggruppano in *cluster* in funzione della tipologia d'impianto in esame. In particolare gli impianti ad aria primaria, climatizzazione con fancoils, appaiono correlati a cariche batteriche totali aerodisperse significativamente più alte (Tabella 1). Il grafico 3 rappresenta la distribuzione delle cariche batteriche aerodisperse correlate alle due tipologie d'impianto. Appare evidente come, nel caso degli impianti a tutt'aria, le rilevazioni si raggruppino nella quasi totalità dei punti di prelievo al di sotto delle 100 o addirittura 50 UFC che, secondo quanto proposto

dalla European Collaborative Action nel 1993 per gli ambienti *indoor*, corrispondono a valori di contaminazione ambientale "bassi" o "molto bassi". Diversamente, per gli impianti ad aria primaria, le cariche rilevate evidenziano una contaminazione microbica valutabile secondo la European Collaborative Action come "intermedia".

Il fenomeno potrebbe essere spiegato considerando che nel caso degli impianti a tutt'aria, l'aria trattata e climatizzata è per la maggior parte prelevata all'esterno e solo in parte minore riciclata dall'aria in ripresa, salvo casi particolari, come le sale operatorie, in cui non viene utilizzata aria di ricircolo. L'utilizzo di aria ripresa dagli ambienti già climatizzati, consente un notevole risparmio energetico per il riscaldamento e di ridurre il processo di umidificazione durante il periodo invernale.

Presumibilmente, quindi, la concentrazione di agenti biologici dovrebbe essere simile o migliore, se i filtri sono efficienti, a quella dell'aria esterna e non essere influenzata dalla presenza di fonti di contaminazione all'interno degli ambienti e dalla eventuale contaminazione delle sezioni di umidificazione. Gli impianti ad aria primaria, invece, sono associati a dispositivi secondari necessari come complemento per la climatizzazione degli ambienti, spesso rappresentati da fancoils che ricircolano l'aria ambiente per ore. Inoltre, gli impianti ad aria primaria non avendo ripresa e quindi non potendo riutilizzare aria già climatizzata, devono necessariamente sottoporre l'aria a continui processi di umidificazione, aumentando il rischio di contaminazione microbiologica. La sezione di umidificazione, infatti, è uno dei punti critici per il rischio biologico negli impianti aeraulici. Queste sono ancora, molto spesso, del tipo ad acqua con ricircolo (come confermano anche i dati raccolti); l'acqua venendo solo in parte sostituita, può accumulare ingenti concentrazioni batteriche. Inoltre, nel caso di malfunzionamenti del sifone di drenaggio (le cui pareti sono spesso ricoperte da spessi strati di biofilm) si formerebbero accumuli d'acqua contaminata a contatto con l'aria trattata. In questo caso, quindi, la presenza di fonti di contaminazione interne agli ambienti, principalmente persone in numero rilevante data la tipologia di ambienti monitorati (ospedali, uffici, banche ecc), e la necessità di umidificazione continua, potrebbero spiegare i valori di carica batterica sensibilmente più elevati.

Per quanto riguarda i dati sui livelli di contaminazione degli impianti, il fatto che non fossero sempre disponibili i dati relativi ai campionamenti delle superfici all'interno delle condotte o su altre superfici dell'UTA, ha reso impossibile un'analisi statistica dettagliata.

Nonostante ciò, però, è emersa una sostanziale differenza tra la media dei valori delle cariche microbiche all'interno degli impianti ad aria primaria e quella degli impianti a tutt'aria.

I primi sembrano avere cariche batteriche più basse dei secondi, con valori medi pari a circa la metà (rispettivamente 103 e 201 UFC). Il dato potrebbe essere in parte spiegato considerando il meccanismo di funzionamento dell'impianto; infatti, va considerato che nelle condutture degli impianti a tutt'aria una certa percentuale dell'aria che passa è aria di "ripresa" e quindi potenzialmente contaminata, mentre, negli impianti ad aria primaria è tutta aria esterna. Inoltre, sul risultato potrebbe pesare il fatto che, casualmente, gli impianti a tutt'aria non risultavano essere stati sottoposti a operazioni di bonifica negli ultimi 5 anni, a differenza di quelli ad aria primaria per i quali erano riportate non solo manutenzioni ordinarie, effettuate anche su quelli a tutt'aria, ma anche ricorrenti operazioni di bonifica.

Le informazioni forniteci circa i 17 casi di legionellosi, riferibili a 9 dei 107 impianti monitorati, offrono un ultimo spunto d'analisi. Mentre la tipologia degli impianti studiati è distribuita esattamente al 50% tra tutt'aria e aria primaria, il tipo di pacco di umidificazione/deumidificazione dell'Unità di Trattamento dell'Aria, a fronte di una maggior frequenza totale di umidificatori con acqua di ricircolo (40% degli impianti per i quali è stata fornita l'informazione), appare in 6 (67%) dei 9 impianti correlati a casi di legionellosi, del tipo con acqua a perdere, che rappresenta il 20% degli impianti monitorati. Inoltre, 14 dei 17 casi erano correlati ad impianti a servizio di strutture ospedaliere, la qual cosa, oltre a confermare che la polmonite del legionario è una patologia di tipo opportunistica che evolve in seguito a infezione di persone spesso già immunocompromesse, forse è anche imputabile al fatto che la diagnosi è stata effettuata con maggior puntualità nel caso di pazienti ospedalizzati e, quindi, più facilmente sottoponibili ai necessari test di screening. Infine, è bene sottolineare che laddove sono stati identificati i sierotipi di *L. pneumophila* presente nei campioni d'acqua prelevati nelle torri di raffreddamento e nelle UTA, quelli più frequentemente isolati erano il sierotipo 2 e il 14 seguiti dal 9 e dal 4. Il campione a nostra disposizione è sicuramente poco numeroso ma fa riflettere sul fatto che i sierotipi riscontrati non coincidono con quelli più frequentemente associati alla patologia, principalmente il sierotipo 1, il ritrovamento del quale appare, invece, piuttosto raro.

In conclusione, quindi, pur considerando i limiti del presente lavoro, dovuti alla modalità di raccolta "a posteriori" dei dati, sembra emergere il ruolo degli impianti come rilevante per la qualità dell'aria *indoor*. In particolare, la tipologia d'impianto appare correlata al grado di contaminazione microbiologica dell'aria e si conferma il ruolo determinante non solo della manutenzione ordinaria ma anche di quella straordinaria per il mantenimento di condizioni igienico sanitarie adeguate.

Merita ulteriori approfondimenti lo studio della dinamica delle popolazioni delle diverse specie di legionella e la verifica della reale incidenza delle patologie correlabili con sierotipi diversi dall'1 della *L. pneumophila*, che sono spesso rilevati nell'acqua delle torri di raffreddamento e delle UTA ma raramente correlati con la patologia. La prevenzione della legionellosi e delle altre patologie riconducibili alla qualità dell'aria indoor richiede, quindi, di approfondire la conoscenza di diversi aspetti quali: l'ecologia dei microrganismi coinvolti, i metodi di bonifica e i loro meccanismi d'azione. Conoscenze indispensabili affinché si possa valutare e ridurre efficacemente il rischio di esposizione.

#### Bibliografia da completare

- 1) Angles ML, Chandy JP, Cox PT, Fisher IH, Warnecke MR, 2007. Implications of biofilm-associated waterborne *Cryptosporidium* oocysts for the water industry. *Trends Parasitol.* 23: 352-356.
- 2) Bentham RH, 2000. Routine sampling and the control of *Legionella* spp. in cooling tower water system. *Current Microbiology*; 41, 271-275.
- 3) Borella P, Montagna MT, Stampi S, Stancanelli G, Romano Spica V, Triassi M, Bargellini A, Marchesi I, Tatò D, Spilotros G, De Luca G, Sacchetti R, et al., 2004. Indagine multicentrica sui fattori di rischio correlati alla presenza di *Legionella* spp nell'acqua di strutture pubbliche e private. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene* 45 (4):328
- 4) Campos C, Loret JF, Cooper AJ, Kelly RF, 2003. Disinfection of domestic water systems for *Legionella pneumophila*. *J. Water Suppl.* 52: 341-354
- 5) Cirillo D, Falkow S, Tompkins LS, 1994. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect Immun* 62: 3254-61
- 6) Emtiaz F, Schwartz T, Marten SM, Krolla-Sidenstein P, Obst U, 2004. Investigation of natural biofilms formed during the production of drinking water from surface water embankment filtration. *Water Res* 38, 1197-1206.
- 7) Falkinham JO, 2002. Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin Chest Med.* 23: 528-551.
- 8) Fields BS, Benson RF, Besser RE, 2002. Legionella and Legionnaires' Disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 15 (3): 506-26
- 9) Fiore AE, Nuorti JP, Levine OS, Marx A, Weltman AC, Yeager S, Benson RF, Pruckler J, Edelstein PH, Greer P, Zaki SR, Fields BS, Butler JS, 1998. Epidemic legionnaires disease two decades later: old sources, new diagnostic methods. *Clin Infect Dis* 26: 426-433.
- 10) Garbe LP, Davis JB, Weisfeld JS, Markowitz L, Miner P, Garrity F, Barbaree JM, Reingold AL, 1985. Nosocomial legionnaires disease: epidemiologic demonstration of cooling towers as a source. *JAMA* 254; 521-524.
- 11) Grobe S, Wingender J, Truper HG, 1995. Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems. *J Appl Bacteriol* 79: 94-102.
- 12) Helmi K, Skraber S, Gantzer C, Willame R, Hoffmann L, Cauchie HM, 2008. Interactions of *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, vaccinal polyovirus type 1 and bacteriophage  $\pi$ X174 and MS2 with drinking water biofilm and wastewater biofilm. *Appl Environ Microbiol* 74: 2079-2088.
- 13) ISS, 2007. La legionellosi in Italia. Rapporto annuale
- 14) Kuiper MW, Wullings BA, Akkermans ADL, Beumer RR, van de Kooij D, 2004. *Intracellular proliferation of Legionella pneumophila in Harmanella vermiformis in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride.* *Appl Env Microbiol* 70: 6826-6833
- 15) Leoni E, De Luca G, Legnani P.P., Sacchetti R, Stampi S, Zanetti F, 2005. *Legionella waterline colonization: detection of Legionella species in domestic, hotels, hospital hot water systems.* *J. Appl. Microbiol.* 98: 373-379.
- 16) Mackerness CW, Colbourn JS, Keevil CW, 1991. *Growth of Aeromonas hydrophila and Escherichia coli in a distribution system biofilm model.* In: *Health related microbiology.* Morris R. (Eds) IAWPRC, London UK 131-139.
- 17) Messi P, Guerrieri E, Bondi M, 2003. *Bacteriocin-like substance (BLS) production in Aeromonas hydrophila water isolates.* *FEMS Microbiol Lett* 220: 121-125
- 18) Messi P, Guerrieri E, Bondi M, 2005. *Antibiotic resistance and antibacterial activity in Heterotrophic bacteria of mineral water origin.* *Sci Total Environ* 346: 213-219
- 19) Pagnier I, Merchat M, La Scola B, 2009. *Potentially pathogenic amoeba-associated microorganisms in cooling towers and their control.* *Future Microbiol*; 4: 615-629.
- 20) Roig J, Sabria M, Maria L PB, 2003. *Legionella spp: community acquired and nosocomial infections.* *Curr Opin Infect Dis* 16(2) : 145-51
- 21) Schulze-Robbecke R, Fischeider R, 1989. *Mycobacteria in biofilms.* *Zentralbl Hyg Umweltmed.* 188: 385-390.
- 22) Searcy KE, Packman AI, Atwill ER, Harter T, 2006. *Capture and retention of Cryptosporidium parvum oocysts by Pseudomonas aeruginosa biofilms.* *Appl Environ Microbiol* 72: 6242-6247.
- 23) Storey MV, Ashbolt J, 2001. *Persistence of two model enteric viruses (B40-8 and MS-2 bacteriophages) in water distribution pipe biofilms.* *Water Sci Technol.* 43: 133-138.
- 24) Storey MV, Ashbolt J, Stenstrom TA, 2004. *Biofilms, thermophilic amoeba and Legionella pneumophila - a quantitative risk assessment for distribution water.* *Water Sci Technol* 50: 77-82.
- 25) Turetgen I, 2004. *Comparison of free residual chlorine and monochloramine for efficacy against biofilms in model and full scale cooling towers.* *Biofouling* 20: 81-85.
- 26) Turetgen I, Cotuk A, 2006. *Efficacy of monochloramine against surface-associated Legionella pneumophila in a cooling tower model system.* In: *Legionella, state of the art 30 years after its recognition.* NP. Cianciotto et al. (Eds). ASM Press, Washington D.C.
- 27) Turetgen I, Cotuk A, 2007. *Monitoring of biofilm-associated Legionella pneumophila on different substrata in model cooling tower system.* *Environ Monit Assess*; 125: 271-279.
- 28) Turetgen I, Sungur EI, Cotuk A, 2005. *Enumeration of Legionella pneumophila in cooling tower water systems.* *Environ Monit Assess*; 100: 53-58.
- 29) Yamamoto H, Sugiura M, Kusunoki E, Ezaki T, Ikedo M, Yabuuchi E, 1992. *Factors stimulating propagation of legionellae in cooling tower water.* *Appl Environ Microbiol*; 58, 1394-1397
- 30) Valster RM, Wullings BA, Bakker G, Smidt H, van der Kooij D, 2009. *Free-Living Protozoa in Two Unchlorinated Drinking Water Supplies, Identified by Phylogenetic Analysis of 18S rRNA Gene Sequences.* *Appl Environ Microbiol* 75: 4736-4746
- 31) Wery N, Bru-Adan V, Minervini C, Delgenes JP, Garrelly L, Godon JJ, 2008. *Dynamics of Legionella spp. and bacterial populations during the proliferation of L. pneumophila in a cooling tower facility.* *Appl Environ Microbiol*; Maggio: 3030-3037
- 32) WHO guidelines for indoor air quality. 2009. Dampness and mould