

Applicazioni di Next Generation Sequences (NGS) e metagenomica nello studio della prevalenza ambientale di *Legionella* spp. alla luce della nuova direttiva europea sull'acqua destinata al consumo umano: Direttiva UE 2020/2184 (Dlgs 18/2023).

RESPONSABILE SCIENTIFICO DEL PROGETTO:

Dott.ssa Sandra Cristino, Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali
Alma Mater Studiorum - Università degli Studi di Bologna

SEDE DEL PROGETTO

Laboratorio di Microbiologia Ambientale e biologia molecolare (MAb), Dipartimento di Scienze Biologiche, Geologiche e Ambientali (BiGeA), Università degli Studi di Bologna.

INTRODUZIONE

L'acqua è una risorsa fondamentale ed un fattore determinante per la salute umana pertanto la sicurezza microbiologica dell'acqua è, tuttora, un aspetto di grande rilievo nella trasmissione di malattie, nonostante i progressi tecnologici per il trattamento e la depurazione della stessa (WHO (2010-2018).

Tra le malattie trasmesse dall'acqua un importante ruolo all'interno delle comunità rivestono le infezioni da *Legionella* spp. *Legionella* è l'unico genere della famiglia delle Legionellaceae, si tratta di bacilli Gram negativi, aerobi, non sporigeni, generalmente mobili per la presenza di uno o più flagelli. Al genere attualmente appartengono 60 specie suddivise in 70 sierogruppi, circa la metà dei quali risultano patogeni opportunisti: *L.pneumophila* è la specie maggiormente implicata nella patologia umana (si stima che sia responsabile del 90% dei casi, attribuiti soprattutto ai sierogruppi 1 e 6), seguita da *L.micdadei* (10% dei casi), mentre altre specie, meno frequentemente isolate da campioni clinici, sono *L.dumoffi*, *L.bozemanii*, *L.gormanii*, *L.anisa*, *L.longbeachae* (Fields et al. 2002).

In Italia la legionellosi è una malattia a notifica obbligatoria secondo le indicazioni del D.M. 15/12/90 (DM 15/12/90) e successive integrazioni ed è sottoposta a sorveglianza speciale. L'invio della notifica non sostituisce l'invio della scheda di sorveglianza, secondo quanto previsto dalla Circolare 400.2/9/5708 del 1993 e sue successive modifiche. Pertanto il medico che pone la diagnosi deve compilare la scheda di sorveglianza che deve essere inviata alla ASL di competenza, al Dipartimento di Malattie Infettive (DMIPI) dell'Istituto Superiore di Sanità entro 48 ore (Linee guida Nazionali, Legionellosi, 2015).

I dati dell'ultimo report (2022) relativo alla legionellosi in Italia (casi dell'anno 2021) mostrano come l'incidenza della malattia è pari a 46,0 casi per milione di abitanti con una diversa distribuzione tra

Nord (71,9 per milione di abitanti), Centro (43,9 per milione di abitanti) e Sud (11,6 per milione di abitanti). I dati relativi alle fonti di esposizione rivelano come il 16,4% dei soggetti riferisce un'esposizione a rischio nei 10 giorni precedenti l'inizio dei sintomi. Nel 100% dei casi l'agente responsabile della patologia è stato *Legionella pneumophila*. Il tasso di letalità tra i casi nosocomiali per i quali è noto l'esito della malattia (36,2% del totale) è pari al 40,5%, mentre la letalità dei soli casi comunitari è pari all' 11,2%.

Il principale serbatoio naturale di questo batterio è l'ambiente idrico (ambienti lacustri, corsi d'acqua, acque termali, ecc.) dove esso può moltiplicarsi a temperature tra 25 e 45°C, con un optimum di 35°C. *Legionella* è in realtà in grado di sopravvivere in un range di temperatura molto più ampio, che va da 5,7 a 63°C, non si moltiplica a temperature inferiori a 20°C o superiori a 55°C, pur restando vitale mentre la morte sopraggiunge solo intorno ai 63°C; (Lee et al. 1991).

Dagli ambienti naturali il batterio passa agli ambienti idrici artificiali quali acqua della condotta cittadina, impianti idrici dei singoli edifici, torri di raffreddamento, piscine, ecc, tutti ambienti che diventano amplificatori del microrganismo, in presenza di fattori favorevoli quali temperatura, presenza e accumulo di sedimenti, ristagni nelle vasche di raccolta dell'acqua calda, presenza di incrostazioni calcaree che partecipano alla formazione di biofilm. La presenza di amebe e di altri protozoi favorisce la sopravvivenza di *Legionella*, consentendone la crescita intracellulare grazie all'apporto di sostanze nutritive e, allo stesso tempo, esplicando un'azione protettiva nei confronti dei fattori nocivi ambientali. Dagli amplificatori le legionelle vengono disperse nell'aria grazie ai diffusori che sono rappresentati dai sistemi in grado di generare aerosol: frangi flusso delle docce, rubinetti, sistemi di umidificazione dell'aria, torri di raffreddamento, apparecchiature per la terapia respiratoria assistita, idromassaggi, fontane ornamentali, ecc. (Phin et al. 2014).

La modalità di infezione più comune è infatti rappresentata dall'inalazione o microaspirazione di aerosol contenenti legionelle, oppure di particelle di polvere da esse derivate per essiccamento. Le goccioline si possono formare sia spruzzando l'acqua, sia facendo gorgogliare l'aria in essa, o per impatto sulle superfici solide. Le goccioline più pericolose sono quelle di piccole dimensioni (diametro inferiore ai 5 micron) in quanto possono penetrare più facilmente nelle basse vie respiratorie. Se fino a qualche tempo fa si escludeva totalmente una forma di trasmissione interumana della malattia, due recenti lavori scientifici ne hanno descritto la possibilità (Correia AM. et al., 2016; Borges V. et al., 2016).

La legionellosi può manifestarsi con epidemie dovute ad una fonte comune anche con limitata esposizione in termini di tempo e di spazio all'agente eziologico, oppure con una serie di casi indipendenti in un'area ad alta endemia o con casi sporadici senza un evidente raggruppamento

temporale o geografico. Focolai epidemici si sono ripetutamente verificati in ambienti collettivi a residenza temporanea, come ospedali o alberghi, navi da crociera, esposizioni commerciali, ecc.

Va comunque sottolineato che l'esposizione ad ambienti contaminati non sempre si associa a casi di malattia, infatti, affinché si possa instaurare l'infezione, giocano un ruolo fondamentale due tipi di fattori legati all'ospite e all'ambiente.

La suscettibilità individuale nel contrarre la legionellosi è in relazione a vari fattori quali l'età, il sesso, l'abitudine al fumo e all'alcol, lo stato immunologico e trattamento con glucocorticosteroidi, interventi chirurgici all'apparato respiratorio e cardiaco, trapianti d'organo, neutropenia, tumori solidi, ecc. (Phin N. et al., 2014).

Inoltre il **tempo di esposizione**, la **virulenza** dello stipite batterico e la **carica batterica** infettante sono elementi determinanti per l'acquisizione della malattia, mentre per quanto riguarda **l'ambiente** un ruolo importante è giocato da una serie di fattori, chimici, fisici e microbiologici inerenti l'acqua condottata ossia: la temperatura, la presenza di alghe, amebe, presenza di sostanze biodegradabili organiche e inorganiche (ferro, rame, zinco), che forniscono nutrimento al batterio e protezione grazie alla formazione di biofilm. È da sottolineare, inoltre, il ruolo favorente la colonizzazione dato da alcune caratteristiche dell'impianto idrico quali: fenomeni di ristagno/ostruzione che favoriscono il rallentamento del flusso dell'acqua con formazione di incrostazioni, depositi calcarei, processi di usura e corrosione, che offrono a *Legionella* protezione dall'attività biocida dei disinfettanti ove in uso.

Le infezioni da *Legionella* possono presentarsi in tre diverse forme.

La malattia dei Legionari: si tratta della forma più severa dell'infezione, con letalità media del 10%, che può arrivare al 30-50% nel caso di infezioni ospedaliere e si presenta con polmonite acuta difficilmente distinguibile da altre forme di infezione respiratorie acute delle basse vie aeree. La malattia ha incubazione di 2-10 giorni con disturbi simili inizialmente ad una classica influenza quali: mialgia, cefalea a cui si accompagna febbre alta, tosse, respiro affannoso e sintomi comuni ad altre forme di polmonite. Possono comparire, inoltre, sintomi extrapolmonari utili per la diagnosi differenziale, quali manifestazioni neurologiche, renali e gastrointestinali.

La febbre di Pontiac: è una forma simil-influenzale a breve incubazione (36-48h) che si presenta come malattia acuta autolimitante che non interessa il polmone; dopo il periodo di incubazione compaiono febbre, malessere generale, mialgia, cefalea e, a volte, tosse e gola arrossata. Possono inoltre essere presenti sintomi quali nausea, vertigini o fotofobia. Questo tipo di infezione, contrariamente a quanto segnalato per la forma precedentemente esposta, può colpire anche persone giovani e in buona salute.

Esiste poi una forma subclinica, cioè senza sintomi clinici, che si evidenzia solo con una positività agli anticorpi anti-legionella, in assenza di episodi di polmonite o forme simil-influenzali.

Il metodo diagnostico di elezione della legionellosi è l'isolamento e l'identificazione del microrganismo che richiede tuttavia terreni di coltura speciali; è importante infatti sottolineare che le legionelle non crescono nei terreni tradizionali e richiedono dei tempi di crescita relativamente lunghi, da 4 a 10 giorni. L'isolamento da campioni clinici quali secrezioni respiratorie, broncolavaggio, tessuto polmonare, sangue, essudati (pleurico, pericardico) è estremamente importante e permette uno studio comparativo con i ceppi ambientali al fine di individuare la fonte stessa dell'infezione. La sensibilità è del 60%.

Sempre sui campioni biologici è possibile procedere alla ricerca di antigeni di *Legionella* con immunofluorescenza diretta, o procedere a metodi indiretti quali il rilievo di un movimento anticorpale specifico (reazioni di sierologiche di fissazione del complemento) e di immunofluorescenza indiretta. Da qualche anno poi, alle tecniche tradizionali si è affiancata la possibilità di utilizzare test che determinano la presenza di antigeni di *Legionella* nelle urine delle persone infette, anche questo metodo ampiamente discusso per la sensibilità e specificità del test stesso solo nei confronti di alcune specie di *Legionella* (Rota et al. 2014).

La presenza di un serbatoio ambientale molto ampio, rende impossibile l'eliminazione di *Legionella* negli impianti idrici e di condizionamento. Per questo motivo diventa importante effettuare un approccio "preventivo" in modo da contenere il rischio e minimizzare il numero di casi.

Gli strumenti normativi (Linee guida nazionali Legionellosi 2015, Linee guida Regione Emilia-Romagna, 2017) suggeriscono, infatti, la necessità di un'attenzione riguardo la sorveglianza dei casi di legionellosi non solo a livello nosocomiale (ospedali e case di cura), ma anche ai casi comunitari, agli impianti di climatizzazione, di distribuzione dell'acqua (in alberghi, ospedali, case di cura, studi odontoiatrici, ecc), torri evaporative e sistemi di raffreddamento, impianti termali e ricreativi, fontane decorative, navi da crociera, e a tutti i sistemi generanti aerosol.

Le strategie per combattere la proliferazione della legionellosi in ambito comunitario e civile nascono innanzitutto dalla **prevenzione**, che dovrebbe nascere dalla **corretta progettazione e realizzazione delle reti idriche**, allo scopo di rendere improbabile la contaminazione della *Legionella* negli impianti di distribuzione dell'acqua calda e nei sistemi di condizionamento.

Da qui la grande attenzione, che viene data all'adozione del concetto di "Prevenzione e Monitoraggio Ambientale" anche in realtà diverse da quelle più tipicamente associate alla diffusione del microorganismo, quali quelle ricreative e industriali in cui l'acqua, sia come acqua potabile, sia come acqua calda sanitaria o acqua destinata alle lavorazioni di processo, possono diventare un serbatoio e

fonte di diffusione del microrganismo. Lo stesso approccio viene poi esteso a tutti gli ambiti diversi da quelli nosocomiali, dove l'uomo per motivi più svariati può ed entra in contatto con aerosol contenete *Legionella*.

Tale aspetto è ampiamente discusso infatti anche dalla normativa riguardante la Tutela e Protezione dei lavoratori, quale il D.Lgs. 81/2008 con le successive modifiche e integrazioni, dove al Titolo X la *Legionella* è classificata al gruppo 2 tra gli agenti patogeni (D.Lgs. nr.81, Aprile 2008).

Tale normativa ben definisce come il rischio di esposizione a *Legionella* in qualsiasi ambiente di lavoro richieda l'attuazione di tutte le misure di sicurezza appropriate al fine di effettuare prevenzione e protezione dei lavoratori.

In letteratura sono riportati, infatti, casi di legionellosi verificatisi tra lavoratori di diverse categorie: Vigili del fuoco, operatori del soccorso pubblico, movimentatori di terra, minatori, lavoratori dell'industria automobilistica, personale addetto alle operazioni di manutenzione/pulizia delle torri evaporative e degli impianti di distribuzione /trattamento acqua sanitaria, addetti agli impianti di depurazione, addetti alla pulizia di turbine nel settore industriale, così come altre categorie in cui l'acqua diventa una fonte di esposizione.

A tale proposito si vuole evidenziare come le nuove Linee guida nazionali del 2015, pongono in grande risalto il concetto di valutazione del rischio in tutti gli ambiti non solo nosocomiali, ma soprattutto in ambito comunitario, ossia lì dove l'uomo è a maggior rischio di esposizione sia per quanto concerne l'attività lavorativa, sia per quanto concerne l'attività ricreativa: strutture termali, piscine, alberghi, campeggi, fontane ricreative, attività di giardinaggio.

Da qui la necessità e l'obbligo di elaborare un **“Protocollo/ Documento di Valutazione del Rischio”** (DVR), articolato in 3 passaggi fondamentali: Valutazione, Gestione e Comunicazione del Rischio. Tale protocollo deve essere esteso e applicato in ogni struttura (sia civile, sia industriale) nel quale siano presenti impianti potenzialmente a rischio.

In ambito della sorveglianza ambientale, la ricerca di *Legionella* è realizzata tramite il metodo colturale che è considerato ancora oggi il gold standard, mentre l'identificazione viene eseguita mediante sequenziamento genico di sequenze geniche quali mip gene, 16SRNA, rpoB. I tempi di coltura sono lunghi (2-8 settimane) e costituiscono uno dei maggiori limiti, oltre alla necessità spesso di ricorrere ad approcci di Whole Genome Sequencing (WGS) seguito da analisi filogenetica, come unico metodo per correlare il caso all'esposizione. (Thomson R: et al 2008, Radomski et al. 2010).

Ancora una volta la conoscenza dell'habitat del microrganismo e delle sinergie con batteri ad esso simili come *Legionella*, potrà suggerire le corrette pratiche per la prevenzione e il contenimento del rischio nella popolazione suscettibile per entrambi i microorganismi.

OBIETTIVI DELLO STUDIO

L'obiettivo dello studio è l'applicazione di metodiche di Next Generation Sequencing (NGS) a supporto della gestione del rischio nell'ambito della sorveglianza ambientale di *Legionella*, pertanto i campionamenti di acqua calda e fredda sanitaria prelevati in strutture sanitarie, socio-sanitarie, comunitarie, prelevati nell'ambito di programmi di sorveglianza ambientale, verranno analizzati attraverso un approccio metagenomico.

L'idea progettuale assume un ruolo rilevante alla luce della nuova Direttiva europea sull'acqua destinata al consumo umano, Direttiva UE 2020/2184 e il recentissimo decreto italiano di recepimento, Dlgs 18/2023. La World Health Organization (WHO), riconoscendo il ruolo della legionellosi come malattia con forte impatto sulla salute pubblica, ha infatti richiesto che tra i parametri "obbligatori" per il requisito di "potabilità" dell'acqua destinata al consumo umano, ci fosse l'inserimento del parametro *Legionella*. Questo vuol dire che dall'entrata in vigore del decreto attuativo, tutte le attività socio-sanitarie, assistenziali e comunitarie (scuole, università, abitazioni private, etc) dovranno applicare l'approccio del Water safety plan alla filiera idropotabile, mediante la ricerca e la sorveglianza della *Legionella*. Chiaramente il nuovo approccio, richiede che l'attività sul territorio venga eseguita da laboratori specializzati, che dovranno unire alle tecniche standardizzate dettate da norme ISO, le più recenti metodologie di sorveglianza e tipizzazione.

L'approccio proposto è quindi in linea con quello presentato in questo progetto: unire alla ricerca mediante coltura, le più recenti metodologie di diagnosi, tipizzazione e valutazione dell'impatto patogenico dei ceppi rilevati.

Tale approccio prevede l'estrazione del DNA e l'analisi del genoma, attraverso piattaforme di sequenziamento NGS e di indagine bioinformatica avanzata, di tutto il materiale genetico presente in un determinato campione ambientale. Ciò rende tale approccio particolarmente fertile nello studio delle comunità microbiche in quanto permette di superare le barriere dei metodi classici basati sull'isolamento e la messa in coltura della singola specie.

L'analisi metagenomica può essere effettuata tramite sequenziamento NGS target-oriented (16S/18S/ITS) che permette la rilevazione della maggior parte dei batteri, funghi e eucarioti presenti in campioni, che potrebbero non essere individuati utilizzando altri metodi, e favorisce la determinazione della loro diversità biologica.

Questa tecnica consente di ottenere sia dati qualitativi relativi alla identificazione delle specie (classificazione tassonomica) presenti nel campione, sia dati quantitativi relativi alla loro abundance (ricchezza).

I dataset metagenomici ottenuti, in associazione ai metadati relativi alle caratteristiche geografiche e ambientali del campione prelevato, (quali ad esempio, pH, temperatura, salinità dell'acqua pre e post trattamento chimico), potranno essere sottoposti ad analisi bioinformatiche comparative (sia spaziali che temporali) che permetteranno di comprendere come si modula la microflora e in particolare le specie in esame (*Legionella* spp) al variare sia di fattori biologici (presenza assenza di altre specie che favoriscono o inibiscono la crescita) che dei fattori chimico/fisici ambientali. Tale comprensione faciliterà le strategie per il miglioramento della sanificazione ambientale e la prevenzione di casi comunitari e nosocomiali.

La metodica NGS verrà estesa inoltre, alla ceppoteca del laboratorio del gruppo di ricerca, al fine di effettuare una genotipizzazione attraverso sequenziamento (tramite geni target specie/specifici o WGS) sia di ceppi già associati e implicati nella patologia umana, che di nuovi isolati rilevati durante le attività di sorveglianza ambientale, i quali a seguito dei profondi cambiamenti climatici, stanno diventando prevalenti nell'ambiente.

Solo una corretta tipizzazione degli isolati circolanti nell'ambiente, la conoscenza delle nicchie ecologiche, le interazioni con altre comunità microbiche e il grado di antropizzazione acquisito, potrà sostenere l'elaborazione di protocolli mirati per la sorveglianza, il contenimento delle infezioni nosocomiali e comunitarie. La conoscenza acquisita, sarà inoltre in grado di guidare la definizione di specifici protocolli di disinfezione, mirati e focalizzati sulle comunità microbiche rilevate, da attuarsi solo dove e quando necessari, evitando l'uso indiscriminato di sostanze chimiche che oltre ad aver un forte carico inquinante per l'ambiente, si sono dimostrate essere in grado di modificare la sensibilità dei ceppi batterici.

CRONOPRAMMA DELLE ATTIVITA' CORRELATE AL PROGETTO:

Cronoprogramma di pianificazione attività e controllo

WP= Work package progetto

		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
WP 1	Valutazione della ceppoteca presente												
WP 2	Scongelamento dei ceppi e rimessa in coltura												
WP 3	Tipizzazione fenotipica per verificare la purezza della colonia scongelata												
WP 4	Estrazione del genoma e quantificazione												
WP 5	Campionamento acqua (calda sanitaria e fredda), analisi colturale e in parallelo metagenomica												
WP 6	Analisi su piattaforma NGS del genoma batterico (nuovi campioni ambientali e ceppoteca)												
WP7	Analisi bioinformatica dei dati, classificazione tassonomica e creazione di alberi filogenetici												