

Creazione di pipelines bioinformatiche per la caratterizzazione di isolati di *Legionella* spp. mediante l'elaborazione di dati di whole genome sequencing.

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).

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 favorenti 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.

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 microorganismo. 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

Dal punto di vista della diagnostica clinica e ambientale, è chiaro come l’utilizzo di una metodica standardizzata in uso dai laboratori che si occupano di diagnosi clinica o prevalenza ambientale sia un grande supporto, ma è evidente come i limiti dell’isolamento colturale possono essere superati solo introducendo dei metodi più veloci e soprattutto più rapidi. Sicuramente l’avvento della genomica ha aumentato la sensibilità in termini di identificazione e correlazione dei ceppi. Si tratta però di un numero elevato di dati che richiedono conoscenze specifiche e capacità di tipo bioinformatico. Il progetto consiste nel creare delle pipelines “in house”, in grado di gestire il flusso di dati bioinformatici generati dalle analisi di Whole genome sequencing (WGS). Tali pipeline potranno essere utilizzate per un rapido screening degli isolati batterici rinvenuti nel territorio per quanto riguarda i geni di patogenicità, virulenza e resistenza batterica. Sarà possibile creare un “database” delle principali caratteristiche dei ceppi, dal punto di vista genotipico, che permetterà di ampliare le conoscenze degli isolati e valutare l’evoluzione degli stessi nel corso del tempo. Pertanto le osservazioni effettuate e il database creato, saranno di supporto agli approcci diagnostici in ambito clinico e ambientale, creando il link tra l’ambiente e la clinica che non deve mai essere trascurato, in quanto sarà l’ambiente dove la *Legionella* vive a dettarne le caratteristiche patogenetiche che potranno far sviluppare la patologia umana.

ATTIVITA' DA SVOLGERE

- Studio di sequenze geniche legate a geni di virulenza, patogenicità e resistenza;
- Allineamento di sequenze delle 65 Legionelle riconosciute e validate;
- Analisi dei genomi sequenziati e depositati;
- Ricerca di geni specie/specifici;
- Assemblaggio di dati di WGS: contigs, scaffolds etc;
- Valutazione della qualità dell'assemblaggio mediante statistica dedicata;
- Allestimento di alberi filogenetici
- Creazione di pipelines per l'allestimento un database delle caratteristiche dei ceppi circolanti sul territorio;