

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA



DOTTORATO DI RICERCA IN
MEDICINA PREVENTIVA E SANITA' PUBBLICA

XXXVII° CICLO

**VALUTAZIONE DI UN INNOVATIVO SISTEMA PER LA SANIFICAZIONE DI
ARIA E SUPERFICI BASATO SU UNA TECNOLOGIA A PLASMA FREDDO
MONITORAGGIO DI PSEUDOMONAS AERUGINOSA IN CAMPIONI DI ACQUA DELLA
REGIONE CAMPANIA, SUD ITALIA**

RELATORE

Chiar.ma Prof.ssa Francesca Pennino

CANDIDATO

Dr. Eugenio Toscano

Contesto

Durante questo periodo di tre anni di Dottorato di Ricerca in Tematiche Green in Sanità Pubblica e Medicina Preventiva svolto presso il Dipartimento di Sanità Pubblica dell'Università di Napoli Federico II di Napoli ho seguito due linee di ricerca. Una in collaborazione con l'azienda Tecnosistem Spa con la quale mi sono occupato della ricerca di articoli scientifici con l'obiettivo, sia di approfondire i fattori di rischio e le modalità di diffusione degli inquinanti ambientali di natura chimica e microbiologica, come virus e batteri su aria e superfici; ma anche valutare le diverse metodiche per la sanificazione di aria e superfici negli ambienti confinati e di come sia possibile renderle più performanti ed estenderne l'utilizzo negli ambienti con grande affollamento, come metropolitane e stazioni ferroviarie. Ai fini di tale studio sono stati considerati quattro aspetti fondamentali: A) la natura degli inquinanti, la via e le modalità di trasmissione; B) l'origine biologica e gli effetti sulla salute; C) il ruolo ed il funzionamento dei sistemi di ventilazione e condizionamento a contaminazione controllata; D) gli approcci per la progettazione di innovativi sistemi basati su modelli informatici. L'altra linea di ricerca si è svolta effettuando la ricerca di *Pseudomonas aeruginosa* in campioni di acqua potabile provenienti da strutture ospedaliere e non nella Regione Campania

1. Introduzione

L'emergenza sanitaria, sociale ed economica causata dell'epidemia da SARS-CoV-2 ha reso necessario intraprendere una serie di studi finalizzati ad impedire la trasmissione dei virus, in particolare nelle strutture ad alto affollamento (infrastrutture di trasporto, ospedali, industrie, attività commerciali, etc.) e nei mezzi di trasporto, studiando nuove strategie e linee di intervento.

In tale ambito, Tecnosistem, società d'ingegneria specializzata nella progettazione di grandi infrastrutture aperte al pubblico e dei mezzi di trasporto con un forte focus nella progettazione e integrazione impiantistica volta al trattamento dell'aria, ha concentrato la propria azione su due aspetti:

- un profondo cambio di paradigma della pratica progettuale dei sistemi di ventilazione e trattamento aria;
- la ricerca di soluzioni tecnologiche innovative correlate ai nuovi target progettuali.

Il cambio della progettazione è rivolto soprattutto ad un ripensamento dei flussi di massa prodotti nell'ambiente e quindi della distribuzione dell'aria, così da impedire sia l'insorgenza di aree di ristagno, sia l'esposizione dei passeggeri a flussi d'aria con possibili agenti patogeni.

Come soluzione Tecnosistem ha scelto di concentrare la propria attenzione su una tecnologia innovativa di sanitizzazione dell'aria con il plasma freddo, NTP (Non Thermal Plasma), rappresentando una delle soluzioni maggiormente interessanti al momento, sia rispetto a soluzioni più o meno simili sia rispetto alle classiche soluzioni di filtrazione meccanica ultrafine, estremamente "pesanti" dal punto di vista dell'impianto, oltre che scarsamente efficaci sui virus.

Tale tecnologia, già utilizzata da alcuni anni, permette la sanitizzazione degli ambienti con presenza umana, con un abbattimento fino al 99,99% di virus, batteri e sostanze volatili tossiche o inquinanti.

L'intervento per la realizzazione e l'applicazione del sistema basato sulla tecnologia a plasma freddo nei grandi ambienti caratterizzati da alto affollamento prevede un intervento completo su diversi step.

Il primo è rappresentato da uno studio preliminare del contesto di installazione e delle opere esistenti (o da realizzare) dell'impianto meccanico ed ausiliari di funzionamento, cui può seguire un'analisi dei flussi d'aria negli elementi di impianto e nell'ambiente servito nelle condizioni di funzionamento. Tale studio può avvalersi del supporto di analisi specialistiche, tra cui quelle termofluidodinamiche (CFD 3D), normalmente utilizzate per gli studi di confort, air quality indoor, in applicazioni complesse, oramai da svariati anni.

Il suddetto studio prevede innanzitutto una analisi delle canalizzazioni dell'aria (mandata e ripresa) che viene utilizzata per la valutazione delle perdite di carico e la verifica del flusso di progetto attraverso le bocche, e quindi per la verifica "lato macchina" della distribuzione dell'aria nell'ambiente.

Nel nostro caso tale analisi è stata utilizzata anche per valutare l'influenza dei generatori di plasma sulle diverse condizioni di funzionamento del sistema, nonché per definire la posizione di installazione ottimale, il tipo e la configurazione installativa.

In genere, in caso di retrofit, la predisposizione dei generatori puntuali interni al canale non cambia significativamente le condizioni aerauliche generali della canalizzazione e quindi non è invasiva sullo stato dell'impianto preesistente.

A valle di ciò, l'analisi CFD 3D del volume servito, normalmente usata per valutare il comfort termico degli utenti in condizioni invernali o di raffrescamento estivo, viene utilizzata per lo studio della diffusione della corrente ionizzata nell'ambiente e sulle superfici, in modo da definire la configurazione ottimale dell'intero sistema di sanitizzazione.

L'analisi può essere eseguita in modalità stazionaria o transitoria, verificando anche l'evoluzione di agenti patogeni o inquinanti attraverso l'analisi di trasporto di particolato ultrafine o di gas traccianti per valutare l'efficacia dell'intero sistema.

Tale studio integrato di ambiente servito e sistema di trattamento aria conduce a un dimensionamento dell'intero sistema che può presentare anche diverse possibilità installative, integrate tra loro, avendo come criterio guida sia la riduzione dell'impatto sulle strutture esistenti, sia la facilità di manutenzione, oltre ovviamente all'efficacia della purificazione dell'aria.

A valle di ciò è stato effettuato il progetto di dettaglio della sistemazione degli apparati di sanitizzazione e degli ausiliari necessari e delle implementazioni necessarie all'impianto meccanico, a cui è seguita la fase di installazione dei dispositivi. Quindi la messa in servizio e la fase di collaudo.

Sono state studiate, inoltre le problematiche installative e di ingombro dei moduli sanitizzanti e di accessibilità per il montaggio e la manutenzione straordinaria. Sono state analizzate le diverse configurazioni installative e i relativi dimensionamenti dei sistemi ionizzanti; si sono iniziate quindi a studiare tutte le problematiche relative all'alimentazione elettrica e alla compatibilità con i sottosistemi di bordo.

Sono state quindi isolate delle configurazioni ottimali e si è riusciti a effettuare una prima progettazione di massima del sistema, minimizzando o talvolta anche annullando l'impatto visivo dell'implementazione.

2. Materiali e Metodi

Con il termine plasma si indica una miscela di gas ionizzati composta da una gran quantità di particelle caricate, come ioni o elettroni, radicali liberi, molecole e anche atomi neutri.

Può essere generato artificialmente fornendo ad un gas un'energia sufficientemente alta. Nel caso del plasma freddo (NTP), si utilizzano le cosiddette scariche non termiche, che nel nostro caso sono ottenute mediante barriera di dielettrico. Le diverse specie attive così generate, tra cui sono preponderanti i radicali prodotti dall'ossigeno, dall'azoto e dal vapor d'acqua, vengono trasportate dal flusso d'aria verso gli agenti inquinati. Si tratta di un sistema attivo di sanificazione dell'aria, che decompone i principali inquinanti senza creare sostanze residue; viene considerato il processo più sicuro per ossidare e scomporre tali sostanze. Oltre a ciò, numerosi studi e test sperimentali dimostrano che il plasma freddo è in grado di inattivare molti tipi diversi di microrganismi, come muffe, virus e batteri, sia su superfici che in aria. L'azione antimicrobica del NTP

generato è dovuta principalmente a particelle reattive che trasportano cariche elettriche, che si concentrano sulla superficie delle membrane causandone la distruzione.

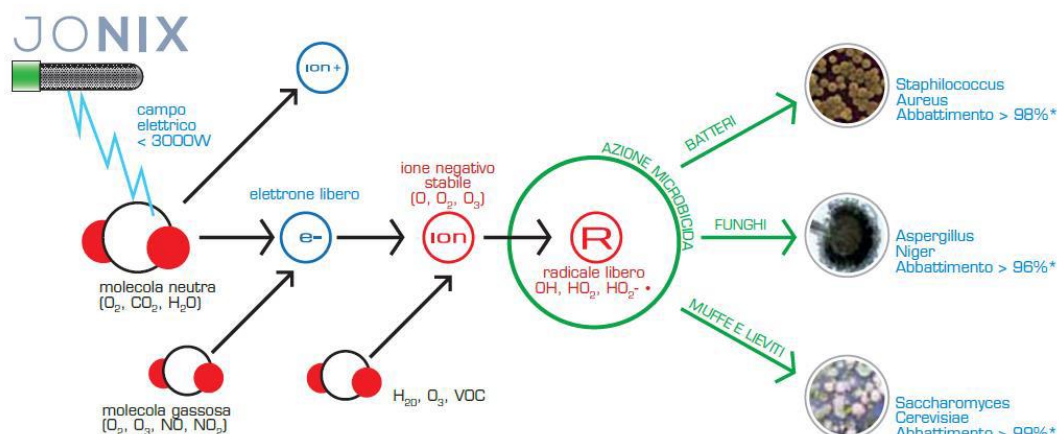


Fig. 1- Modalità di azione del dispositivo sanitizzante JONIX con tecnologia NTP

I moduli prescelti sono predisposti all'interno dei canali di areazione, e sono costituiti da un'elettronica di controllo, racchiusa all'interno di un involucro isolante, e dagli attuatori, ovvero le unità ionizzanti esposte al flusso d'aria.

L'elettronica presente sul dispositivo è predisposta per l'invio al sistema centrale di controllo, in tempo reale, di un eventuale segnale di allarme in caso di avaria del sistema di ionizzazione.

E' importante notare che, per forma e modalità di funzionamento, tali moduli occupano solo una parte ridotta della sezione trasversale del condotto e quindi hanno un impatto nullo o trascurabile sulle condizioni fluidodinamiche della canalizzazione, largamente inferiore ad esempio a quella di un generico sistema di filtrazione meccanica, condizione questa estremamente importante in caso di retrofit su impianti già esistenti.

Ultimo, ma non meno importante, l'installazione dei moduli all'interno dei canali permette di avere un impatto visivo praticamente nullo.

Per la nostra sperimentazione sono stati scelti due diversi autobus della società EAV fermi al Deposito EAV, sito in Via Volpicella, 344 – Napoli. La valutazione dell'efficacia del sistema Jonix Steel 4C è stata determinata in conformità al protocollo proposto da Jonix ricevuto via mail in data 7 febbraio 2022, che ha previsto la misura delle concentrazioni di inquinanti chimici e microbiologici prima e dopo l'installazione di tali apparecchiature sui mezzi scelti per il campionamento. In particolare sono state esposte, a diversi step temporali, piastre Petri di 90 cm di Ø precedentemente contaminate con materiale di riferimento certificato (ceppi ATCC) in due diversi autobus della Società EAV uno con il sistema Jonix Steel installato e uno di controllo senza sistema.

2.1 Efficacia del Sistema

Utilizzato come alternativa agli attuali sistemi di Ventilazione e Condizionamento a Contaminazione Controllata, questo sistema di disinfezione costituito da un generatore di plasma con tecnologia NTP (Non Thermal Plasma) Jonix Steel 4C - Installazione "stand alone" in ambiente con quattro generatori è stato sottoposto a diverse prove effettuate in laboratori accreditati allo scopo di valutarne le capacità sanitizzanti. In particolare l'abbattimento della carica batterica, virucida, dei VOC e degli odori, è stata testata principalmente dai Laboratori ARCHA di Pisa, accreditato da Accredia con numero 0522. Mediante

l'accreditamento, ARCHA dimostra le proprie competenze per l'esecuzione del campionamento, delle analisi in laboratorio, dell'organizzazione dei documenti e della gestione ed elaborazione dei dati in base alla conformità legislativa dei vari aspetti.

I microrganismi testati presso i Laboratori ARCHA rispetto ai quali è stata verificata l'efficacia della tecnologia NTP sono i seguenti:

- Salmonella spp.
- Escherichia Coli
- Listeria monocytogenes
- Staphylococcus aureus
- Pseudomonas aeruginosa

Dalle prove effettuate è risultato evidente come **già a brevi tempi di contatto (2 minuti), l'attività biocida dell'aria NTP è risultata del 100%**: le piastre esposte a aria NTP non mostrano alcuna crescita dei ceppi microbici testati, che invece si sono normalmente sviluppati sulle piastre esposte semplicemente all'aria.

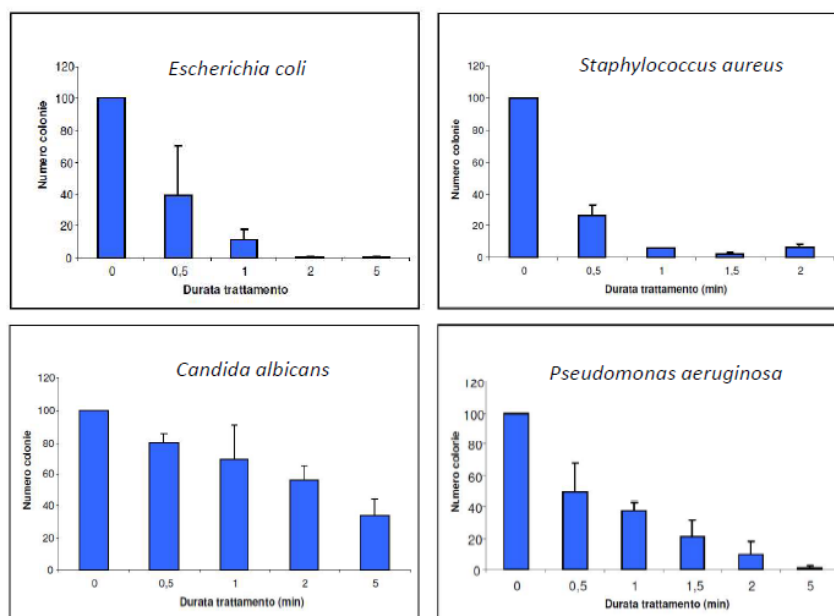


Fig. 5- Grado di attenuazione batterica al variare del tempo per diversi microorganismi testati

Anche presso il Dipartimento di Medicina Molecolare dell'Università di Padova il Prof. Crisanti ed i suoi collaboratori ne hanno testato l'efficacia per contrastare il diffondersi dell'epidemia da Covid-19. Le conclusioni dello studio hanno evidenziato che il dispositivo JONIX riesce ad abbattere la carica virale del 99,9999% in meno di 30 minuti, con un'efficacia anche superiore di 3 unità logaritmiche a quanto richiesto dalle norme tecniche perché un prodotto possa essere considerato "virucida".

Il vasto dossier scientifico, realizzato fin dal 2016, ha dimostrato l'efficacia della tecnologia NTP-JONIX oltre che su virus e batteri, anche su funghi ed una vasta gamma di inquinanti chimici come i VOC.

In tale ambito è stata ad esempio rilevata un'importante azione sui principali inquinanti inorganici, come gli ossidi di azoto (NOx), diossido di zolfo (SO2) o acido solfidrico (H2S).

VOC – Volatile Organic Compounds	Abbattimento % post trattamento NTP	Composti Inorganici Volatili/Gassosi	Abbattimento % post trattamento NTP
Toluene	> 95	NOx	> 95
TBA (tribomanisolo)	> 95	SOx	> 95
Acetati di etile	> 95	H ₂ S	> 95
Acetato di butile	> 95	CO	> 95
Acetaldeide	> 95		
Butanale	> 95	NH ₃	> 95
Dicloroetilene	> 95		
TCE	> 95		
1,2 DCP	> 95		
Metilcicloesano	> 95		
Ottano	> 95		
PCE	> 95		
Xileni	> 95		
Aromatici C9	> 95		
Acido Acetico	> 95		
Acido Propionico	> 95		
Acido Iso-butirrico	> 95		
Acido Butirrico	> 95		
Acido Iso-valerico	> 95		
Acido Valerico	> 95		
Acido Caproico	> 95		
Acido Caprilico	> 95		
Composti alifatici (C5-12)	> 95		
Composti aromatici (C7-C10)	> 95		
Composti organici volatili	> 95		

Fig. 3 - Grado di attenuazione di diversi composti volatili organici (VOC) e inorganici

Ulteriori test sono stati inoltre effettuati per verificare l'azione su **bio-aerosol infetti** con vari microrganismi dispersi in una corrente fluida: in tal caso, ovviamente non più dipendente dal tempo di esposizione ma solo dalla portata fluida, si è rilevata una **sanificazione pressoché totale della corrente**, anche con portate d'aria elevate; risultato importante soprattutto se comparato con altre tecnologie, quali quella a fotocatalisi, caratterizzata da un repentino calo di efficacia al crescere delle velocità di attraversamento della corrente fluida e quindi inadeguata per l'utilizzo all'interno di canalizzazioni di aria di mandata o ripresa.

L'efficacia sanitizzante è stata inoltre avvalorata da numerosi studi, attività di test e conseguenti applicazioni già effettuate in sale operatorie ospedaliere.

Ovviamente, oltre a tali test sul modulo Jonix, esiste una letteratura internazionale estremamente ampia riguardo gli effetti sanitizzanti della corrente d'aria ionizzata con tecnologia NTP in genere.

In particolare, si possono citare studi che hanno analizzato il meccanismo di sterilizzazione dell'aria, o altri che hanno analizzato il ruolo delle diverse specie reattive prodotte dall'NTP nella neutralizzazione della carica batterica. Secondo tali lavori:

“I plasmii a bassa temperatura e pressione atmosferica hanno dimostrato di possedere caratteristiche germicide molto efficaci. La progettazione relativamente semplice ed economica, oltre alla loro natura non tossica, danno loro il potenziale per sostituire i metodi di sterilizzazione convenzionali nel prossimo futuro.”

2.2 Classificazione medica

Il dispositivo proposto costituito da un generatore di plasma con tecnologia NTP (Non Thermal Plasma) Jonix Steel 4C è riconosciuto, come DM (Dispositivo Medico) di Classe 1 dal Ministero Della Salute.

Un DM di classe 1 è intrinsecamente non nocivo per la salute di persone e animali.

I dispositivi medici sono raggruppati, in funzione della loro complessità e del potenziale rischio per il paziente, in quattro classi: I, IIa, IIb, III.

La classificazione dipende dalla destinazione d'uso indicata dal fabbricante e va attribuita consultando le regole di classificazione riportate nell'Allegato IX del Decreto legislativo 24 febbraio 1997, n 46.

Tale classificazione si attua fondamentalmente tenendo conto dell'invasività del dispositivo, della sua dipendenza da una fonte di energia (dispositivo attivo) e della durata del tempo di contatto con il corpo.

2.3 Effetti sulla salute

Come confermato da numerosi studi una moderata ionizzazione dell'aria **ha effetti benefici sulla salute umana**, essendo capace di influenzare i processi di produzione della serotonina nel sangue, neurormone capace di influenzare positivamente vari processi come il sonno, la trasmissione di impulsi nervosi e il cambiamento dell'umore agendo quindi come un tranquillante naturale. Altri studi hanno evidenziato un effetto benefico nel trattamento di asma, sinusiti e bronchiti di natura allergica.

2.3 Protocollo analitico

Per la prova sono state utilizzate le seguenti preparazioni pure, omogenee e stabili di microrganismi liofilizzati con proprietà microscopiche, macroscopiche, fenotipiche e genotipiche ben caratterizzate:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Enterococcus faecium* ATCC 6057

Per ogni tipologia di microrganismo sono state inoculate 10 piastre Petri contenenti terreno di coltura Plate Count Agar (PCA), un terreno utilizzato per la determinazione del contenuto microbico totale in diverse matrici ambientali, per un totale di 40 piastre di PCA.

N.20 piastre inoculate (nello specifico: 5 piastre di PCA contaminate per ciascuno dei 4 microrganismi ATCC indicati in precedenza) sono state posizionate aperte nel Bus con il sistema Jonix Steel 4C installato (bus trattato) e le altre n.20 piastre posizionate nel Bus di controllo senza sistema Jonix.

Le piastre inoculate con i 4 microrganismi ATCC scelti sono state esposte ai seguenti step temporali nel bus trattato e nel bus di controllo: 1 ora; 2 ore, 4 ore, 6 ore e 24 ore. Durante l'intera durata della prova il dispositivo Jonix, nel bus trattato, è stato mantenuto costantemente acceso e le porte e i finestrini dei due bus (trattato e controllo) sono stati mantenuti sempre chiusi.

2.4 Inoculo piastre

Le prove sono state condotte nei Laboratori del Dipartimento di Sanità Pubblica sito in Via Pansini, 5 di Napoli nell'area dedicata alle prove microbiologiche, da operatori abilitati all'esecuzione delle analisi.

L'abilitazione degli operatori segue un rigido protocollo di formazione, addestramento e verifiche periodiche mediante confronti interlaboratorio e viene monitorato secondo le procedure interne al Dipartimento, che riprendono i criteri richiesti dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018.

Le piastre Petri contenenti terreno PCA utilizzate per la prova sono state preparate in laboratorio partendo dal terreno liofilo e su di esse sono state effettuate le prove per la valutazione della performance in accordo alla norma UNI EN ISO 11133:2020.

Di seguito si riportano i ceppi ATCC utilizzati (Ditta Microbiologics) con il numero di lotto e la data di scadenza:

- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (lotto 353-476-3 scadenza 30.04.2023)
- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (lotto 360-493-3 scadenza 31.07.2022)
- ✓ *Escherichia coli* ATCC 8739 (lotto 483-1197-1 scadenza 31.03.2023)
- ✓ *Enterococcus faecium* ATCC 6057 (lotto 1052-18-2 scadenza 30.06.2022)

I ceppi sono stati disciolti in brodo di coltura, secondo le istruzioni fornite del venditore, in data 27 aprile 2022, 0.1 ml del brodo di coltura è stato inoculato e spatolato sulla superficie della piastra Petri in modo da arrivare ad una concentrazione di challenge tra 10^2 e 10^3 ufc/ml.

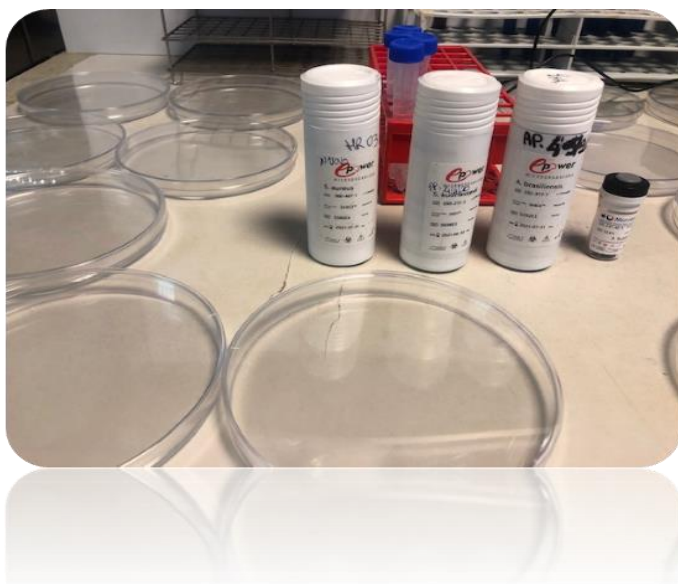


Figura 1: Materiale di lavoro

Una volta contaminate, le piastre sono state portate in idonee condizioni, presso il deposito EAV per la prova.

Una volta arrivati al deposito n.20 piastre contaminate con i ceppi ATCC sono state posizionate nel bus con il sistema Jonix Steel 4C installato (bus trattato) e n.20 piastre nel Bus di controllo senza sistema Jonix. Le piastre sono state posizionate a gruppi di 4 (una piastra di PCA contaminata con ciascuno dei 4 microrganismi ATCC scelti) sui sedili dei due bus come riportato nella Figura 2.



Figura 2: Bus di controllo con piastre esposte

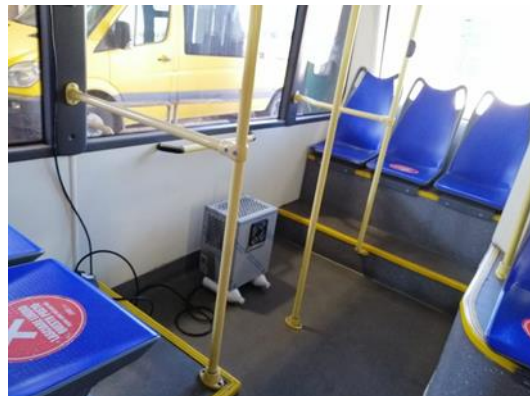


Figura 3: Bus con sistema Jonix

Dopo 1h di esposizione, gli operatori sono entrati nei bus hanno chiuso il primo gruppo di n.4 piastre di PCA e sono usciti richiudendo le porte. La stessa procedura è stata eseguita per gli altri step temporali stabiliti (2 ore, 4 ore, 6 ore e 24 ore).

Le piastre una volta chiuse sono state trasportate in laboratorio e incubate a 37°C per 24-48h.

3. Risultati

Le tabelle e i grafici seguenti mostrano i risultati delle concentrazioni di microrganismi ATCC testati ai diversi tempi di esposizione sia nel bus di controllo che in quello trattato.

Tabella 1: Risultati concentrazioni ceppi testati nel bus di controllo ai diversi tempi di esposizione

<i>Microrganismi ATCC testati</i>				
<i>Tempo di esposizione</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1h	160 ufc	124 ufc	106 ufc	220 ufc
2h	250 ufc	119 ufc	132 ufc	280 ufc
4h	280 ufc	160 ufc	138 ufc	220 ufc
6h	230 ufc	140 ufc	120 ufc	250 ufc
24h	190 ufc	88 ufc	125 ufc	260 ufc

Tabella 2: Risultati concentrazioni ceppi testati nel bus trattato con sistema Jonix Steel 4C - Installazione "stand alone" in ambiente, ai diversi tempi di esposizione

<i>Microorganismi ATCC testati</i>				
<i>Tempo di esposizione</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1h	51 ufc	101 ufc	88 ufc	210 ufc
2h	24 ufc	40 ufc	54 ufc	240 ufc
4h	13 ufc	13 ufc	38 ufc	200 ufc
6h	7 ufc	19 ufc	16 ufc	130 ufc
24h	0 ufc	0 ufc	0 ufc	8 ufc

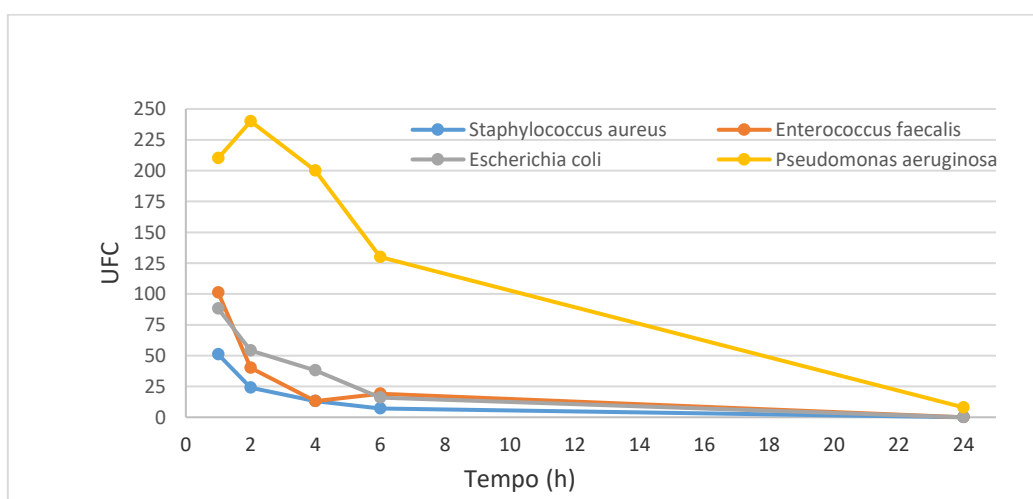


Grafico 1: Valori di carica batterica a diversi intervalli temporali Bus con sistema Jonix

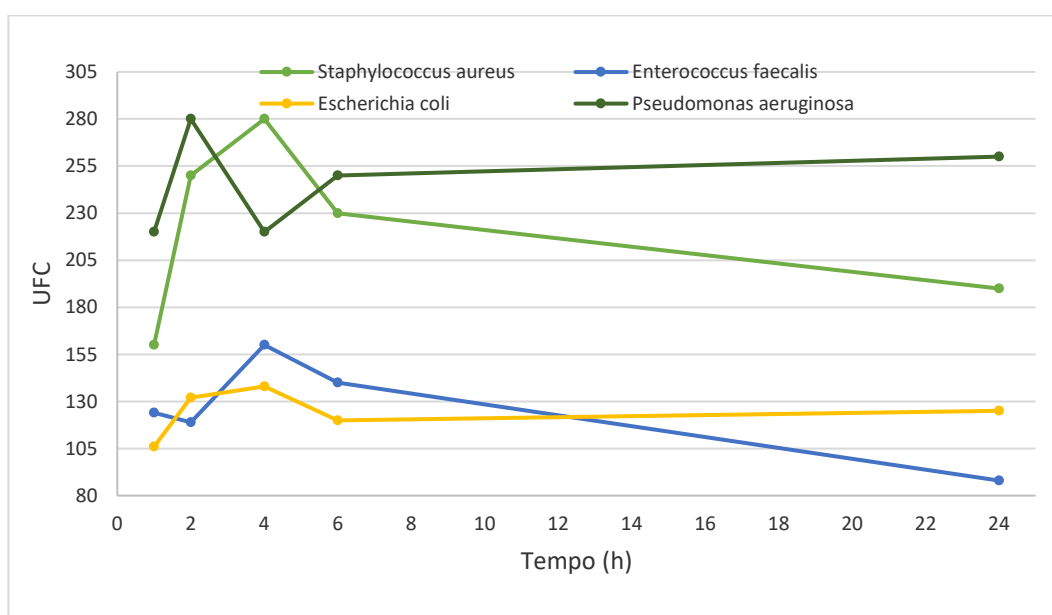


Grafico 2: Valori di carica batterica a diversi intervalli temporali Bus di controllo

4. Conclusioni

Dai risultati ottenuti emerge che nell'autobus con il generatore di plasma con tecnologia NTP (Non Thermal Plasma) Jonix Steel 4C - Installazione "stand alone" in ambiente, si è ottenuta una riduzione superiore al 50% dei valori di carica batterica per *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* già dopo 1h di esposizione delle piastre (rispettivamente 52.9% e 60.4%). Per *Escherichia coli*, dopo 1h di esposizione si è rilevata una riduzione dei valori di carica del 33.6%, mentre per *Pseudomonas aeruginosa* una riduzione di carica significativa si è osservata dopo 6h di esposizione (30.1%).

I ceppi di *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* sono stati più suscettibili al sistema Jonix Steel 4C, infatti dopo 4h di esposizione si sono osservate diminuzioni delle cariche rispettivamente del 74.5% e 87.1%, mentre per *Escherichia coli* solo dopo 6h di esposizione si sono raggiunte percentuali di riduzione dell'81.8%. Dopo 24 ore di esposizione al sistema Jonix, si è registrata una riduzione del 100% dei valori di carica microbica per tutti i ceppi, ad eccezione di *Ps. aeruginosa* per il quale la riduzione osservata è stata del 96.2%.

Nel bus di controllo non sono state osservate riduzioni significative per nessun microrganismo testato.

5. Discussione

Visti i risultati, considerando anche il basso impatto tecnologico per l'integrazione nel sistema di trattamento aria, ciò rende tale soluzione, di gran lunga quella maggiormente interessante allo stato attuale dell'arte.

In sintesi, il sistema di sanificazione con **plasma freddo** (Non-Thermal Plasma - NTP) rappresenta un'innovazione che si distingue nettamente dai metodi tradizionali e da altre tecnologie avanzate, principalmente per la sua capacità di agire in modo **continuo e sicuro in presenza di persone**.

Di seguito è riportata una rassegna dei metodi alternativi comuni, sia tradizionali (chimici) che avanzati (fisici/tecnologici) posti a confronto con la tecnologia del plasma freddo per la sanificazione di aria e superfici.

5.1 Metodi Alternativi Comuni e Avanzati

5.1.1 Metodi Chimici Tradizionali

Questi metodi si basano sull'uso di sostanze chimiche con forte potere ossidante o disinfettante per eliminare i microrganismi:

- **Ozono (O₃):** Potente ossidante, viene generato da appositi macchinari per sanificare aria e superfici. È molto efficace contro batteri, virus e funghi, ma richiede l'evacuazione dell'ambiente durante il trattamento a causa della sua tossicità ad alte concentrazioni.
- **Perossido di Idrogeno (H₂O₂):** Utilizzato in diverse formulazioni (liquido, gassoso ionizzato) è versatile e potente contro virus e batteri. La sua nebulizzazione o la sua forma gassosa ionizzata (spesso combinata con il plasma stesso) permettono di raggiungere anche gli angoli nascosti.
- **Acido Peracetico:** Potente contro batteri, virus e funghi, è utile per aria e acqua, ma ha un forte odore di aceto.
- **Soluzioni a base di Alcol:** Usate principalmente per la pulizia e la disinfezione rapida delle superfici.

5.1.2 Metodi Fisici e Tecnologici Avanzati

Queste tecniche sfruttano fenomeni fisici per neutralizzare gli inquinanti e i patogeni, spesso integrandosi nei sistemi di ventilazione o condizionamento:

- **Purificatori a Fotocatalisi:** Utilizzano una combinazione di **raggi UV** e un rivestimento superficiale (catalizzatore, spesso TiO₂) per decomporre gli inquinanti organici (VOC) e i patogeni presenti nell'aria attraverso un processo di foto-ossidazione.
- **Filtrazione (es. Filtri HEPA):** Non è propriamente un metodo di "sanificazione" che uccide i patogeni, ma è essenziale per la **purificazione** dell'aria. I filtri HEPA (High Efficiency Particulate Air) rimuovono fisicamente particelle, polveri sottili (PM₁₀, PM_{2.5}), pollini, e la maggior parte dei microbi dall'aria.
- **Ionizzazione Bipolare (diversa dal Plasma Freddo):** Genera ioni positivi e negativi che si attaccano alle particelle inquinanti (inclusi microbi e allergeni) presenti nell'aria, facendole aggregare e depositare o facilitandone la rimozione da parte dei filtri.

5.2 Vantaggi del Plasma Freddo (Non Thermal Plasma - NTP)

Il Plasma Freddo (NTP) si sta affermando come una tecnologia innovativa e spesso preferita per la sanificazione continua e in presenza di persone grazie ai seguenti specifici vantaggi:

ASPETTO	VANTAGGIO DEL PLASMA FREDDO	CONFRONTO CON ALTRI METODI
Sicurezza Ambientale e Umana	Non utilizza prodotti chimici o additivi dannosi e non genera ozono né sottoprodotti tossici durante il funzionamento (se correttamente tarato).	L' Ozono richiede l'evacuazione dell'ambiente. I prodotti chimici lasciano residui e possono essere corrosivi o irritanti.
Efficacia Igienizzante	Distrugge rapidamente microrganismi (virus, batteri, funghi), inattivando i microbi e abbattendo allergeni e composti organici volatili (VOC) mediante specie reattive dell'ossigeno (ROS) .	La Fotocatalisi ha tempi di reazione potenzialmente più lunghi per l'abbattimento microbico. I Filtri rimuovono i microbi ma non li distruggono attivamente.
Sanificazione Continua	Può funzionare in modo continuo e sicuro anche in presenza di persone , fornendo un'azione sanificante costante dell'aria e, per saturazione, delle superfici.	I trattamenti con Ozono o concentrazioni elevate di Perossido di Idrogeno sono eseguiti in assenza di persone.
Versatilità e Applicazione	Essendo un gas ionizzato, si espande in modo uniforme in tutto l'ambiente, sanificando sia l'aria che le superfici, raggiungendo punti difficili.	I metodi basati sulla disinfezione di superficie o nebulizzazione possono non garantire una copertura uniforme in ogni angolo.
Sostenibilità e Manutenzione	È una tecnologia ecologica , richiede bassa manutenzione e ha tempi di trattamento rapidi.	I Filtri (es. HEPA) richiedono una sostituzione periodica costosa, e la loro efficienza può diminuire nel tempo se non mantenuti.

5.3 Certificazioni

I dispositivi di sanitizzazione costituenti il sistema oggetto della presente nota sono dotati delle seguenti certificazioni e sono stati oggetto di 3.500 test chimici, 5.700 test microbiologici e 1.200 test comparativi, presso enti di ricerca pubblici e privati:

5.3.1 MARCATURA CE: Prodotti conformi alle direttive Europee

Direttiva comunitaria, di un prodotto regolamentato nell'Unione europea, il quale dichiara che il prodotto è conforme ai requisiti di sicurezza previsti dalle direttive o dai regolamenti comunitari applicabili.

In particolare, si segnala che il prodotto è conforme alle normative europee:

- Direttiva 2006/42/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 maggio 2006 relativa alle macchine e che modifica la direttiva 95/16/CE
- Direttiva 2011/65/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio dell'8 giugno 2011 sulla restrizione dell'uso di determinate sostanze pericolose nelle apparecchiature elettriche ed elettroniche
- Direttiva 2014/30/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 26 febbraio 2014 concernente l'armonizzazione delle legislazioni degli Stati membri relative alla compatibilità elettromagnetica
- Direttiva 2014/35/UE del

Parlamento Europeo e del Consiglio del 26 febbraio 2014 concernente l'armonizzazione delle legislazioni degli Stati membri relative alla messa a disposizione sul mercato del materiale elettrico destinato a essere adoperato entro taluni limiti di tensione

DICHIARAZIONE CE DI CONFORMITÀ	
JONIX S.R.L. SEDE LEGALE Viale Spagna, 31/33 - 35020 Tribano (PD) SEDE SCIENTIFICA Via Tegulaia 10/b - 56121 Pisa SEDE OPERATIVA Via Romagnoli, 12/A - 40010 Bentivoglio (BO)	
dichiara che il prodotto di seguito identificato	
DESCRIZIONE	Moduli canalizzabili per la sanificazione attiva e purificazione dell'aria
MODELLI	• Duct • DuctR • VMC Selezionare il modello a cui la dichiarazione si riferisce
Codice	xxx
Matricola	xxx
E' CONFORME alla DIRETTIVA 2011/65/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO dell'8 giugno 2011 sulla restrizione dell'uso di determinate sostanze pericolose nelle apparecchiature elettriche ed elettroniche alla DIRETTIVA 2014/30/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 26 febbraio 2014 concernente l'armonizzazione delle legislazioni degli Stati membri relative alla compatibilità elettromagnetica (ex direttiva 2004/108/CE) alla DIRETTIVA 2014/35/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 26 febbraio 2014 concernente l'armonizzazione delle legislazioni degli Stati membri relative alla messa a disposizione sul mercato del materiale elettrico destinato a essere adoperato entro taluni limiti di tensione (ex direttiva 2006/95/CE) Norme di riferimento EN 60335-2-65:2003/A11:2012 Sicurezza degli apparecchi elettrici d'uso domestico e similare -- Norme particolari per gli apparecchi per la purificazione dell'aria La presente dichiarazione di conformità è rilasciata sotto la totale responsabilità esclusiva del fabbricante	
General manager Mauro Mantovan	
Funzione	Firma

5.3.2 TÜV PROFICERT Certificazione della qualità dei dispositivi

TÜV PROFiCERT certifica la qualità dei processi di produzione dei dispositivi Jonix Prodotti validati e continuamente monitorati. Il logo TÜV, per i dispositivi Jonix, certifica la veridicità dei dati e delle performances dichiarate nei dossier scientifici e nei cataloghi prodotti.



5.3.3 ONGREENING E PRODUCTMAP La piattaforma per il Green Building

Ongreening® è una piattaforma digitale indipendente dedicata alla filiera dell'edilizia green che supporta la diffusione delle migliori pratiche sostenibili rendendo il green building accessibile a tutti. I dispositivi Jonix per la purificazione dell'aria contribuiscono a soddisfare i requisiti di valutazione degli edifici ecologici: Leed®, Breeam®, Estidama®, HK Beam®, Well®.



5.3.4 BIO-SAFE La Certificazione Bio-Safe® è marchio di garanzia per la salute ed il benessere abitativo all'interno dei luoghi confinati

I dispositivi Jonix sono stati testati, secondo il protocollo brevettato Bio-Safe® che ha verificato e certificato la loro capacità di riduzione dei contaminanti attraverso analisi di laboratorio con camera di prova (UNI EN 16000) capaci di verificare le loro potenzialità emissive e attraverso rilievi ambientali (UNI EN 14412) in grado di restituire il livello di purificazione d'aria raggiunto dagli stessi all'interno dei locali di utilizzo.



Bibliografia

- Alex Lindsay, B. B. (2014). Fertilization of Radishes, Tomatoes, and Marigolds Using a Large-Volume Atmospheric Glow Discharge, *Plasma Chem Plasma Process*, 34 1271' - 1290.
- Arijana Filipic, I. G.-A. (2020). Cold plasma, a new hope in the field of virus inactivation. *Trends in Biotechnology*.
- Arne M. Vandenbroucke, R. M. (2011). Non-thermal plasmas for non-catalytic and catalytic VOC abatement, *Journal of Hazardous Materials*, 195, 30 - 54.
- Brandenburg, R. (2017). Dielectric barrier discharges: progress on plasma sources and on the understanding of regimes and single filaments. *Plasma sources sci. Technol.* 26, 053001 (29pp).
- Brandenburg, R. K.-D. (2014). Plasma based pollutant degradation in gas streams: status, examples and outlook. *Contrib. Plasma Phys.* 54, 202 - 21-4.
- Bratislav M, Obradović, G. B. (2011). A dual-use of DBD plasma for simultaneous NO_x and SO₂ removal from coal combustion flue gas. *Journal of Hazardous Materials* volume 785, Issues 2-3, 1280-1286.
- Carlos M. Nunez, G. H. (2012). Corona Destruction: An Innovative Control Technology for VOCs and Air Toxics, *Waste*, 242-247.
- Charles Thomas Parker | Sarah Wigley | George M Garrity (2009) *Nomenclature Abstract for Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900 (Approved Lists 1980).
- Chulkyoon, P. P. (2016). Non-thermal plasmas (NTPs) for inactivation of viruses, *Research Journal of Biotechnology*, Vol.11 (6).
- CL Enloe, M. M. (2008). Time-correlated force production measurements of the dielectric barrier discharge plasma aerodynamic actuator. *Journal of applied physics*, 103 (7), 07 3302-073302.
- Dayonna p. park, K. D.-A. (2013). Reactive nitrogen species produced in water by non-equilibrium plasma increase plant growth rate and nutritional yield. *Current Applied Physics*, 13 S19 - S29.
- Dobrynin D., F. G. (2009). Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New J. Phys.*, 11.
- Hao Zhang, D. M. (2017). Non-thermal plasma technology for organic contaminated soil remediation, a review, *Chemical Engineering Journal* (313), 157-170.
- Harstad, J. (1969). Evaluation of air filters with submicron viral aerosols and bacterial aerosols. *American Industrial Hygiene Association Journal*.
- Herrmann H.W., H. I. (1999). Decontamination of chemical and biological warfare, (CBW) agents using an atmospheric pressure plasma jet (APPJ). *Phys. Plasmas*, 6, 2284-2289
- J. Han, B. P., (July 5-10, 2015). Non-equilibrium plasmas in agriculture. 22nd International Symposium on Plasma Chemistry'

- J Karuppiaha, E.L. (2012). Abatement of mixture of volatile organic compounds (VOCs) in a catalytic non-thermal plasma reactor. *Journal of Hazardous Materials* 283- 289
- K. Urashima, J. C. (2000). Removal of volatile organic compounds from air streams and industrial flue gases by nonthermal plasma technology. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* (Volume: 7, Issue: 5), 602 - 614'
- Kim, H. (2004). Nonthermal plasma processing for air-pollution control: a historical review, current issues, and future prospects' *Plasma Processes and Polymers*, 9L-110.
- Kong M.G., K. G. (2009). Plasma medicine: an introductory review. *New J. Phys.*, 11.
- Laroussi, M. (2005). Low temperature plasma-based sterilization: Overview and state-of-the-art. *Plasma Process Polym.*, 391-400.
- Leipold, M. L. (2004). Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *International Journal of Mass Spectrometry*, 233 (1- 3), 81-86.
- M. Laroussi, F. (2004). Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *International Journal of Mass Spectrometry* 233, 81-86.
- Marco Schiavon, (2015). Potential of non-thermal plasmas for helping the biodegradation of volatile organic compounds (VOCs) released by waste management plants. *Journal of Cleaner Production* 104, 211-219.
- Marco Schiavon, (2017). Non-thermal plasma assisting the biofiltration of volatile organic compounds. *Journal of Cleaner Production* 148, 498-508.
- Michael J. Gallagher, A, G. (2004). Non-thermal plasma application in air sterilization. *Conference Paper in IEEE International Conference on plasma Science*.
- Oda, T. (2003). Non-thermal plasma processing for environmental protection: decomposition of dilute VOCs in air. *J. Electrostat* 57, 293-311.
- Osman Karatum, M. A. (2016), A comparative study of dilute VOCs treatment in a non-thermal. *Chemical Engineering Journal* 294, 308-315.
- Penetrante, B. S. (2011). Non-thermal plasma techniques for pollution control: Part A-overview, fundamentals and supporting technologies and part B-electron beam and electrical discharge processing. *NATO ASI Ser Ser G* 84, 1296-1300.
- Puligundla Pradeep and Mok Chulkyoon, Non-thermal plasmas (NTPs) for inactivation of viruses in abiotic environment - *Department of Food Science and Biotechnology, Gachon University, Seongnam* 13120, KOREA mokck@gachon.ac.kr.
- S. Schmid, M. J. (2010), Degradation of volatile organic compounds in a non-thermal plasma air purifier. *Chemosphere*, 124 - 130.
- Sang-Hye Ji, K.-H. C.-H. (2016). Effects of high voltage nanosecond pulsed plasma and micro DBD plasma on seed germination, growth development and physiological activities in spinach. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 605,117 - 128.
- Schiavon, M. R. (2016). Comparison between conventional biofilters and biotrickling filters applied to waste bio - drying in terms. *Environ. Technol.* 37, 975-982

- Schiavon, M. T. (2017). Non-thermal Plasma as an Innovative Option for the Abatement of Volatile Organic Compounds: a Review. *Water Air Soil Pollut* , 228,388.
- Seinfeld, J., & Pandis, S. (1998). Atmospheric Chemistry and Physics. From Air Pollution to. In *John Wiley & sons, inc.*
- Tian Xia, Abby Kleinheksel, Eric M. Lee, Zhong Qiao, Krista R. Wigginton and Herek L. Clack., Inactivation of airborne viruses using a packed bed non-thermal plasma reactor - *Journal of Physics D: Applied Physic*, 2019, 52.25: 255201.
- U. Kogelschatz, B. E, (1997), Dielectric-Barrier Discharges. Principle and Applications. *Journal de Physique IV Colloque*, 07, C4-47 -C4-66.
- Wen-Jun Liang, H.-P. F.-X.-Q, (2011). Performance of non-thermal DBD plasma reactor during the removal of hydrogen sulfide, *Journal of Electrostatics* Volume 69, Issue 3, 206-213.
- Wu Y., L. Y. (2015). M52 virus inactivation by atmospheric-pressure cold plasma using different gas carriers and power levels. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81, 996-1002.
- Yasuda H., M. T. (2010). A., Biological evaluation of DNA damage in bacteriophages inactivated by atmospheric pressure cold plasma. *Plasma Process Polym.*, 7 301-308 .
- Zulfam Adnana, S. M. (2017). Exhaust gases depletion using non-thermal plasma (NTP). *Atmospheric Pollution Research* (volume 8, issue 2), 338-343.

INDICE

Contesto	pag. 1
Capitolo I: Introduzione	pag. 1
Capitolo II: Materiali e Metodi	pag 3
Paragrafo 2.1: Efficacia del Sistema	pag 4
Paragrafo 2.2: Classificazione Medica	pag 5
Paragrafo 2.3: Effetti sulla Salute	pag 6
Paragrafo 2.4: Inoculo Piastre	pag 7
Capitolo III: Risultati	pag. 9
Capitolo IV: Conclusioni	pag. 11
Capitolo V: Discussione	pag. 11
Paragrafo 5.1.1: Metodi Chimici Tradizionali	pag 11
Paragrafo 5.1.2: Metodi Fisici Tecnologici Avanzati	pag 12
Paragrafo 5.2: Vantaggi del Plasma Freddo (Non Thermal Plasma)	pag 12
Paragrafo 5.3: Certificazioni	pag 13
Paragrafo 5.3.1: Marcatura CE	pag 13
Paragrafo 5.3.2: TUV Proficert	pag 13
Paragrafo 5.3.3: Ongreening e Productmap	pag. 13
Paragrafo 5.3.4: Certificazione Bio Safe	pag. 14
Bibliografia	pag. 15

6. Contesto

Nell'ambito della seconda linea di ricerca, mi sono occupato del monitoraggio ambientale per la ricerca di *Pseudomonas aeruginosa* in campioni di acqua destinata al consumo umano nella Regione Campania. Tra marzo e settembre 2024, sono stati prelevati e sottoposti ad analisi microbiologica un totale di 393 campioni di acqua destinata al consumo umano, raccolti dai rubinetti di 21 strutture sanitarie ospedaliere e 26 strutture sanitarie non ospedaliere della Regione Campania. La caratterizzazione dei ceppi è avvenuta mediante l'esecuzione del saggio di suscettibilità antimicrobica con il metodo della microdiluizione in brodo e il sequenziamento dell'intero genoma. L'agente patogeno è stato isolato in 47 campioni (12,0%), di cui 26 provenienti da contesti ospedalieri e 21 da strutture non ospedaliere. Tutti gli isolati hanno mostrato resistenza alle cefalosporine di prima e seconda generazione, all'ampicillina e all'ampicillina/sulbactam. Un sottoinsieme di ceppi è risultato resistente al cefepime, una cefalosporina di quarta generazione. In particolare, sedici dei 47 isolati sono risultati multi-resistenti (MDR): dieci originati da ospedali e sei da contesti non ospedalieri. I ceppi MDR rappresentano il 34,0% degli isolati totali (16/47). In questo studio di sorveglianza, sono stati identificati tredici (27,6%) distinti tipi di sequenza (Sequence Types - STs), evidenziando una popolazione eterogenea. Il genotipo più frequentemente riscontrato è stato l'ST 309. È stata inoltre documentata la presenza di un medesimo clone in diversi reparti del medesimo ospedale. L'identificazione dello stesso clone in differenti strutture suggerisce una diffusione di *P. aeruginosa* attraverso la rete idrica. Il presente studio ha documentato la presenza e circolazione di *P. aeruginosa* in ambienti sanitari (ospedalieri e non), sottolineando l'inderogabile necessità di attuare una sorveglianza ambientale rigorosa, in special modo nei contesti che ospitano popolazioni a rischio o vulnerabili. L'esecuzione regolare di tale monitoraggio (unitamente alla sua estensione ad altri microrganismi d'interesse per la salute pubblica) è cruciale per la prevenzione delle infezioni umane (infezioni correlate all'assistenza, ICA e infezioni comunitarie).

7. Introduzione

Pseudomonas aeruginosa è un microrganismo eterotrofo, motile, Gram-negativo, con una morfologia a bastoncello (bacillo), le cui dimensioni sono di circa 1–5µm in lunghezza e 0,5–1,0µm in larghezza. È riconosciuto come patogeno opportunista poiché raramente aggredisce individui sani. Dal punto di vista clinico, la vulnerabilità maggiore è riscontrabile nei pazienti con sistemi immunitari compromessi. Le infezioni in questa popolazione di pazienti risultano complesse da gestire a causa di una pluralità di meccanismi di resistenza agli antimicrobici e della sua attitudine a produrre biofilm multicellulari. Questo batterio costituisce un modello per l'analisi della virulenza. È agevolmente reperibile nella quasi totalità degli ecosistemi soggetti a influenza antropica o animale, sebbene possa essere isolato in concentrazioni ridotte da una vasta gamma di ambienti, inclusi il terreno e le risorse idriche.

È un aerobio facoltativo che si sviluppa mediante respirazione aerobica e respirazione anaerobica, utilizzando il nitrato quale accettore finale di elettroni. *P. aeruginosa* è in grado di proliferare anche in condizioni di anaerobiosi sfruttando l'arginina e presenta limitate capacità fermentative che, solitamente, sostengono un accrescimento estremamente lento o nullo. L'organismo può metabolizzare oltre 100 tipi di molecole organiche come fonte di carbonio e/o energia e, in qualità di prototrofo, ha tipicamente la facoltà di crescere su un substrato di coltura a base di sali minerali minimi con un'unica fonte di carbonio ed energia. *P. aeruginosa* prospera in modo ottimale a 37°C, ma può resistere in un ampio range di temperature, che spazia dai 4°C ai 42°C; le sue condizioni di sviluppo ideali in termini di pH corrispondono a valori compresi tra 6.6 e 7.0. È un microrganismo tipicamente del suolo capace di degradare gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), ma è

spesso individuato anche in bacini idrici inquinati da effluenti animali e umani, come le acque reflue e i lavandini all'interno dei presidi ospedalieri.

7.1 Scoperta ed Etimologia

Fu il farmacista francese Carle Gessard a descrivere per la prima volta *P. aeruginosa* nel suo studio del 1882 intitolato 'Sulla colorazione blu e verde delle bende'. *P. aeruginosa* produce molteplici pigmenti in coltura, ma è plausibile che Gessard stesse analizzando la piocianina (pyocyanin), un composto fenazinico blu/verde che esibisce al contempo proprietà antimicrobiche e tossiche. L'appellativo *Pseudomonas* trae origine da due termini greci: Pseudo, che significa 'falso', e monas, che sta per 'unità singola'; *aeruginosa*, che indica 'blu-verdastro', deriva invece dal latino *aerūgō*, che denota 'rame arrugginito'. Le due varianti di laboratorio più frequentemente adoperate sono PAO1 e PA14, ed entrambe sono state impiegate per la creazione di risorse genomiche, incluse librerie di mutanti per trasposoni pubblicamente disponibili e organizzate. In aggiunta, una risorsa digitale altamente validata è attualmente accessibile su www.pseudomonas.com, la quale integra costantemente nuove scoperte a livello genomico e molecolare, e PAMDB.

7.2 Rischio Clinico e Resistenza

P. aeruginosa mostra spesso resistenza a molteplici categorie di antibiotici e agenti terapeutici, circostanza che lo rende problematico durante l'infezione poiché può risultare arduo da curare. È comunemente etichettato come patogeno 'opportunista' in quanto attacca di rado soggetti in buona salute. Dal punto di vista clinico, la criticità primaria coinvolge i pazienti con difese immunitarie compromesse, tra cui quelli con fibrosi cistica (FC), neoplasie (cancro), AIDS, dispositivi medici impiantati a lungo termine (indwelling medical devices), lesioni da ustione, affezioni oculari e ulcere diabetiche che non cicatrizzano. Gli individui immunocompromessi sono i più esposti al pericolo di infezione da *P. aeruginosa*, poiché il microrganismo può eludere con facilità le difese immunitarie innate e quelle acquisite dell'ospite.

Specificamente, i pazienti a rischio includono quelli con fibrosi cistica, neoplasie, ustioni, infezioni neonatali, malattie ematologiche maligne (neoplasie ematologiche), trapianti e patologie polmonari croniche. *P. aeruginosa* è infatti il batterio Gram-negativo che più di ogni altro innalza il rischio di infezioni nei pazienti ustionati, innescando così gravi stati di sepsi e mortalità. Gli episodi di trasmissione nelle infezioni correlate all'assistenza sanitaria (Healthcare-Associated Infections - HAIs) avvengono mediante strumentazioni mediche contaminate, le mani del personale sanitario e il contagio inter-paziente. Inoltre, la persistenza di *P. aeruginosa* è favorita da reservoir ospedalieri come apparecchiature per la ventilazione e l'emodialisi, lavabi, sistemi idrici, servizi igienici, superfici; in particolare, l'acqua di rete (del rubinetto) è considerata una fonte di colonizzazione sottostimata per questo agente batterico. Un ulteriore patogeno veicolato dall'acqua che causa HAIs è la *Legionella*. Numerose indagini hanno esplorato la sua presenza in campioni idrici ospedalieri, come i lavori di Torre et al., Laganà et al., Vincenti et al., Lombardi et al. Inoltre, l'acqua potabile, attraverso il contagio fecale, può fungere da veicolo di infezione, come nel caso dell'epatite virale. *P. aeruginosa* è un microrganismo che si adatta con notevole versatilità all'ambiente ed è annoverato tra i più deleteri; infatti, è tra i patogeni più frequentemente isolati nelle infezioni acquisite in ospedale (nosocomiali) ed è il secondo agente eziologico di polmonite con tassi di decesso che toccano il 50%.

P. aeruginosa è un microrganismo dotato di una notevole capacità di adattamento ambientale ed è annoverato tra i più insidiosi; difatti, figura tra i patogeni maggiormente isolati nelle infezioni nosocomiali ed è il secondo agente eziologico di polmonite, con tassi di letalità che raggiungono il 50%.

Gli individui con deficit immunitario (immunocompromessi) sono i più esposti al pericolo di infezione da *P. aeruginosa*, poiché il batterio può eludere con facilità le difese immunitarie innate e acquisite dell'ospite. Specificamente, i pazienti a maggior rischio includono quelli affetti da fibrosi cistica, neoplasie, gravi ustioni, infezioni neonatali, neoplasie ematologiche, soggetti sottoposti a trapianto e individui con patologie polmonari. *P. aeruginosa* è infatti il batterio Gram-negativo che più di ogni altro innalza il rischio infettivo nei pazienti ustionati, determinando così quadri clinici severi di sepsi e mortalità. Gli eventi di trasmissione nelle infezioni correlate all'assistenza sanitaria (HAIs) si verificano tramite dispositivi medici contaminati, le mani del personale di assistenza (operatori sanitari) e il contagio paziente-paziente. Inoltre, la persistenza di *P. aeruginosa* è agevolata da fonti di contaminazione intra-ospedaliera come strumentazioni per la ventilazione ed emodialisi, lavabi, risorse idriche, servizi igienici, superfici; in particolare, l'acqua del rubinetto è considerata una riserva di colonizzazione sottovalutata per questo batterio. Un altro agente patogeno veicolato dall'acqua che provoca HAIs è la *Legionella*. Numerosi studi hanno investigato la sua presenza in matrici idriche ospedaliere (campioni d'acqua ospedalieri), come dimostrato in altri studi. Per di più, l'acqua destinata al consumo umano, attraverso la contaminazione fecale, può rappresentare un veicolo infettivo, come nel caso dell'epatite virale.

P. aeruginosa impedisce la penetrazione di diverse molecole antibiotiche attraverso la sua membrana cellulare esterna, risultando quindi resistente a molteplici agenti antimicrobici. *P. aeruginosa* è intrinsecamente resistente alle aminopenicilline, sia in monoterapia che in combinazione con acido clavulanico, così come alla maggior parte delle cefalosporine di vecchia generazione, segnatamente la cefotaxima, una cefalosporina di terza generazione, a causa della biosintesi di una β -lattamasi AmpC inducibile. Tra le classi di antimicrobici che conservano l'attività si annoverano alcuni fluorochinoloni (es. ciprofloxacina e levofloxacina), aminoglicosidi (es. gentamicina, tobramicina e amikacina), alcuni β -lattamici (es. piperacillina-tazobactam, cefepime, ceftazidime, ceftazidime-avibactam, ceftolozane-tazobactam, meropenem, imipenem, doripenem) e le polimixine. L'European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) ha riportato che il 31,0% dei ceppi di *P. aeruginosa* identificati in Europa nel 2021 presentava resistenza ad almeno una delle seguenti categorie antimicrobiche: fluorochinoloni, piperacillina-tazobactam, ceftazidime, carbapenemi e aminoglicosidi, sottoposte a sorveglianza. Questo microrganismo esibisce un'elevata propensione a sviluppare resistenza antimicrobica (AMR) e a strutturare biofilm, causando così sia infezioni nosocomiali che quelle correlate all'assistenza sanitaria. Infatti, è noto che i ceppi di *P. aeruginosa* adottano marcati livelli di meccanismi di resistenza intrinseca e acquisita per neutralizzare la maggior parte degli antibiotici. I ceppi di *P. aeruginosa* multiresistenti e diffusamente farmaco-resistenti (MDR/XDR), definiti "cloni ad alto rischio", si sono propagati a livello globale e rappresentano un'emergenza di sanità pubblica che esige una gestione tempestiva. In Italia, esistono Linee Guida finalizzate alla prevenzione e al controllo di Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* carbapenemo-resistenti nelle strutture sanitarie, le quali forniscono raccomandazioni sul riconoscimento precoce delle infezioni e sulla prevenzione della colonizzazione di questi batteri negli ambienti ospedalieri. Relativamente alla Campania, un rapporto del 2022 incentrato sugli ospedali ubicati nella regione ha evidenziato che *P. aeruginosa* era il quarto patogeno in termini di frequenza di rilevamento nei campioni clinici. I tassi di resistenza a piperacillina/tazobactam, ceftazidime, carbapenemi, fluorochinoloni e aminoglicosidi risultavano più elevati rispetto a quelli osservati in Italia e in Europa, e il livello di resistenza ai carbapenemi aveva subito un incremento rispetto agli anni precedenti. Pertanto, il monitoraggio della presenza di questo agente patogeno negli ambienti sanitari (clinici) (nonché in quelli non clinici) è fondamentale per arginarne la diffusione. Inoltre, diverse indagini hanno descritto focolai epidemici dovuti alla presenza di *P. aeruginosa* nelle risorse idriche, suggerendo la necessità di un controllo microbiologico costante di questo microrganismo nel circuito idrico.

Stando alle nostre attuali conoscenze, si riscontra una carenza di dati sull'indagine di *P. aeruginosa* in campioni idrici nella regione Campania, perciò la nostra ricerca si è prefissa l'obiettivo di valutarne la presenza nell'acqua

di rubinetto in strutture ospedaliere e non ospedaliere di questa zona, fornire una caratterizzazione genomica e determinare il profilo di suscettibilità antimicrobica dei ceppi di *P. aeruginosa* isolati.

7.3 Filogenesi

Studi iniziali che utilizzavano la filogenesi basata su SNP (polimorfismi a singolo nucleotide) del core genome hanno suddiviso i ceppi di *P. aeruginosa* in due gruppi principali (il gruppo I, che include il ceppo PAO1, e il gruppo II, che include il ceppo PA14) e un gruppo minore di linee clonali per lo più non correlate. Più recentemente, studi sul pan-genoma hanno rivelato una struttura della popolazione di *P. aeruginosa* a cinque gruppi [2]. I due nuovi gruppi sono intermedi tra i gruppi I-II e il gruppo III, che è geneticamente distante da tutti gli altri gruppi. Resta da determinare se esista una correlazione significativa tra i ceppi ambientali e quelli clinici.

7.4 Genoma ed Evoluzione

Il primo genoma di *P. aeruginosa* ad essere sequenziato è stato quello del ceppo PAO1 [1], originariamente isolato da una ferita cronica negli anni '50 e ora un ceppo di laboratorio comunemente utilizzato. La sequenza di PAO1 ha una dimensione di 6,3 Mpb (con 5570 open reading frames predette), il che, nell'anno 2000, lo rendeva uno dei genomi batterici più grandi sequenziati. È importante notare che esiste una variazione fenotipica e genomica tra i ceppi PAO1 conservati in diversi laboratori in tutto il mondo; questo è un aspetto da considerare per la riproducibilità degli esperimenti tra diversi gruppi di ricerca.

Un altro ceppo di laboratorio molto usato è PA14, originariamente isolato dall'ambiente come un ceppo altamente virulento che causava un'estesa putrefazione nelle piante, ma che è stato anche isolato da ustioni umane. Il genoma di *P. aeruginosa* contiene un gran numero di regolatori trascrizionali e molti geni coinvolti nel catabolismo, trasporto ed efflusso di composti organici. Questa flessibilità genomica e metabolica è probabilmente la chiave che permette a *P. aeruginosa* di colonizzare e prosperare in una vasta gamma di ambienti.

L'era genomica ha prodotto centinaia di genomi di *P. aeruginosa* provenienti da una vasta gamma di ambienti, sia infettivi che non infettivi. Recenti analisi bioinformatiche hanno rivelato un core genome (genoma essenziale/centrale) e un significativo pan-genome. Uno studio che ha utilizzato nove ceppi di *P. aeruginosa* e un approccio di sequenziamento dell'inserzione di trasposoni (Tn-Seq) per definire i geni essenziali per la fitness su cinque diversi terreni di coltura ha rivelato 321 geni essenziali centrali, che rappresentano il 6,6% del genoma. Un altro studio ha utilizzato oltre 1300 genomi di *P. aeruginosa* provenienti da una varietà di ambienti. Qui, è stato dimostrato che il pan-genome di *P. aeruginosa* è composto da 54.272 geni: 665 di essi sono geni core, 26.420 geni flessibili e 27.187 geni unici. Anche il trasferimento genico orizzontale è probabilmente importante e sono stati identificati oltre 3000 plasmidi putativi e frammentati contenenti geni di resistenza e virulenza. Gli isolati clinici di *P. aeruginosa* spesso portano diversi grandi profagi (assenti in PAO1, ad eccezione del fago filamentoso Pf4, simile a Pf1), che possono contribuire alla fitness e alla virulenza batterica e alla lisi dei ceppi competitori.

La resistenza antimicrobica (AMR) è un problema significativo in alcuni ceppi clinici. L'AMR in *P. aeruginosa* può verificarsi tramite: (a) l'acquisizione di geni di resistenza attraverso il trasferimento genico orizzontale; o (b) mutazioni nei geni già presenti nel genoma, che portano alla sovraregolazione delle pompe di efflusso, delle beta-lattamasi o a cambiamenti nelle porine. I ceppi di *P. aeruginosa* resistenti alle carbapenemasi sono tra i patogeni critici elencati nella lista dei patogeni prioritari dell'OMS.

P. aeruginosa impedisce a varie molecole antibiotiche di penetrare nella sua membrana esterna, quindi è resistente a vari agenti antimicrobici. *P. aeruginosa* è intrinsecamente resistente alle aminopenicilline, sia da sole che in combinazione con acido clavulanico, nonché alla maggior parte delle cefalosporine più datate, in particolare la cefotaxima, cefalosporina di terza generazione, a causa della produzione di una AmpC β -lattamasi inducibile. Tra i gruppi antimicrobici che rimangono attivi ci sono alcuni fluorochinoloni (es. ciprofloxacina e levofloxacina), aminoglicosidi (es. gentamicina, tobramicina e amikacina), alcuni β -lattamici (es. piperacillina-tazobactam, cefepime, ceftazidime, ceftazidime-avibactam, ceftolozane-tazobactam, meropenem, imipenem, doripenem) e le polimixine. L'European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) ha affermato che il 31,0% dei ceppi di *P. aeruginosa* isolati in Europa nel 2021 ha mostrato resistenza ad almeno uno dei seguenti gruppi antimicrobici: fluorochinoloni, piperacillina-tazobactam, ceftazidime, carbapenemi e aminoglicosidi, che erano sotto sorveglianza. Questo microrganismo ha una grande capacità di sviluppare resistenza antimicrobica (AMR) e di creare biofilm, causando così sia infezioni nosocomiali che correlate all'assistenza sanitaria. Infatti, è noto che i ceppi di *P. aeruginosa* utilizzano alti livelli di meccanismi di resistenza intrinseca e acquisita per contrastare la maggior parte degli antibiotici. I ceppi di *P. aeruginosa* multiresistenti e ampiamente farmaco-resistenti (MDR/XDR), considerati "cloni ad alto rischio", si sono diffusi a livello globale e sono diventati una minaccia per la salute pubblica che deve essere gestita con urgenza.

In Italia, esistono Linee Guida volte a prevenire e controllare Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistenti ai carbapenemi nelle strutture sanitarie, che forniscono raccomandazioni sul riconoscimento precoce delle infezioni e sull'evitare la colonizzazione di questi batteri nelle strutture ospedaliere.

Per quanto riguarda la Campania, un rapporto del 2022 condotto sugli ospedali situati nella regione ha osservato che *P. aeruginosa* era il quarto patogeno per numero rilevato nei campioni clinici. I tassi di resistenza a piperacillina/tazobactam, ceftazidime, carbapenemi, fluorochinoloni e aminoglicosidi erano superiori a quelli osservati in Italia e in Europa, e il tasso di resistenza ai carbapenemi era aumentato rispetto agli anni precedenti. Pertanto, il monitoraggio della presenza di questo patogeno negli ambienti clinici (così come non clinici) è importante per prevenirne la diffusione. 22 Inoltre, diversi studi hanno descritto focolai dovuti alla presenza di *P. aeruginosa* nell'acqua, 23,24 suggerendo la necessità di un controllo microbiologico di questo microrganismo nel sistema idrico.

A nostra conoscenza, c'è un'assenza di informazioni sull'indagine di *P. aeruginosa* in campioni d'acqua nella regione Campania, pertanto il nostro studio ha avuto come obiettivo quello di valutare la sua presenza nell'acqua dei rubinetti di strutture ospedaliere e non ospedaliere di questa regione, fornire una caratterizzazione genomica e valutare il profilo di suscettibilità antimicrobica dei ceppi di *P. aeruginosa*.

7.5 Caratteristiche chiave e scoperte

P. aeruginosa è in grado di causare malattie in una varietà di ospiti tra cui piante, nematodi, insetti e mammiferi. Negli esseri umani, è particolarmente problematica nei pazienti affetti da FC (Fibrosi Cistica). Nei polmoni dei pazienti con FC, l'infezione si verifica spesso precocemente nella vita e, nonostante un trattamento aggressivo con antibiotici, l'infezione provoca una progressiva perdita della funzione polmonare e infine la morte. È interessante notare come l'adattamento di *P. aeruginosa* durante l'infezione cronica porti spesso a una perdita di determinanti di virulenza, tra cui la motilità, gli O-antigeni, la secrezione di tipo III e il quorum sensing (QS).

Utilizzando sistemi modello, è stato dimostrato che un gran numero di funzioni sono importanti per la patogenesi di *P. aeruginosa*, inclusa la capacità di formare comunità multicellulari di biofilm (anche

denominate aggregati). La formazione di biofilm e aggregati richiede molteplici funzioni, ma i fattori chiave sono gli esopolisaccaridi, che circondano le cellule e aiutano a resistere a fattori di stress come i batteriofagi e i componenti immunitari dell'ospite. I tre principali polisaccaridi prodotti da *P. aeruginosa* sono alginato, PSL e PEL, ed è stato dimostrato che tutti svolgono un ruolo nella formazione del biofilm in vitro. La produzione di alginato determina un fenotipo mucoide, e i ceppi mucoidi sono comunemente isolati dai polmoni dei pazienti con FC. Esiste una variazione tra i ceppi di *P. aeruginosa* riguardo ai tipi di esopolisaccaridi che producono. La formazione del biofilm è anche mediata da adesine come le lectine, che riconoscono zuccheri specifici sulla superficie delle cellule batteriche adiacenti e anche delle cellule ospiti.

7.6 Quorum Sensing e Cheating Sociale

Il QS è un meccanismo di comunicazione cellula-cellula presente in molte specie di batteri [5]. In *P. aeruginosa*, una complessa cascata regolatoria del QS che coinvolge le molecole segnale N-acil omoserina lattone e alchil-chinolone è stata collegata alla produzione di una serie di esoprodotti tossici coinvolti nella virulenza in modo dipendente dalla densità cellulare. Si ritiene che il QS regoli circa il 10% dei geni in *P. aeruginosa*.

È stato dimostrato che il QS è un tratto sociale in *P. aeruginosa* ed è stato ampiamente utilizzato per studiare la teoria dell'evoluzione sociale. Attraverso questi studi, ora sappiamo che i comportamenti cooperativi possono essere sfruttati da "imbroglianti sociali" (social cheats) e che questi imbroglianti possono avere un impatto sulla virulenza durante l'infezione. Il QS è anche un bersaglio per i farmaci anti-virulenza, che mirano a interrompere la comunicazione tra le cellule di *P. aeruginosa* degradando i segnali QS o bloccando le interazioni segnale/recettore.

7.7 Esoprodotti e Metaboliti Secondari

P. aeruginosa è un prolifico produttore di esoprodotti e metaboliti secondari, inclusi gli antimicrobici/tossine piocianina, proteasi, esotossina A e cianuro di idrogeno. Molti di questi sono regolati dal QS. Inoltre, produce due siderofori, la pioverdina e la piochelina, importanti per la captazione del ferro in ambienti a basso contenuto di ferro. È stato dimostrato che questi metaboliti secondari sono importanti per la fitness di *P. aeruginosa* in diversi ambienti e alcuni sono stati collegati a comportamenti sociali, inclusa la formazione del biofilm.

Il lipopolisaccaride (LPS) si trova nella membrana esterna ed è una molecola di grandi dimensioni composta da un lipide (lipide A) e un polisaccaride costituito da antigene O e un core esterno e interno, uniti da un legame covalente. L'LPS aumenta la carica negativa delle cellule di *P. aeruginosa*, aggiunge integrità strutturale e protegge la membrana da diverse sostanze chimiche. I ceppi di *P. aeruginosa* possono produrre simultaneamente due diversi tipi di antigene O (bande A e B) nella stessa cellula. La banda A (antigene comune) è prodotta da molti ceppi di *P. aeruginosa* e provoca una debole risposta anticorpale. È un omopolimero di d-ramnosio (d-Rha), generalmente lungo circa 70 zuccheri. Al contrario, la banda B (antigene specifico) è altamente immunogena e la natura e il numero degli zuccheri differiscono tra i ceppi di *P. aeruginosa*. Le bande B possono essere riconosciute dagli anticorpi O-specifici, il che ha portato all'identificazione di almeno 20 sierotipi principali (da O1 a O20). A causa della sua natura immunogena, la banda B viene spesso persa nei ceppi isolati da infezioni croniche, con conseguente fenotipo di colonia ruvida (rough). È interessante notare come il passaggio a un fenotipo mucoide da uno non mucoide, spesso comporti la perdita della banda B dell'antigene O.

Ad oggi, in *P. aeruginosa* sono stati identificati cinque sistemi di secrezione proteica (di tipo I, II, III, V e VI) e ognuno di essi ha funzioni diverse. Il sistema di tipo II (T2SS) è talvolta denominato "via di secrezione generale" e promuove la traslocazione nella membrana esterna di eso-proteine di grandi dimensioni (incluse alcune multimeriche) che sono già ripiegate nel periplasma. Il sistema di tipo III (T3SS) controlla l'iniezione di proteine tossiche, chiamate effettori, direttamente nel citosol delle cellule ospiti. Quattro effettori chiave identificati in *P. aeruginosa* sono ExoU, ExoT, ExoY ed ExoS. Una volta iniettati, questi effettori possono causare una rapida morte delle cellule ospiti. I principali gruppi filogenetici (I e II) differiscono nei loro sistemi di tipo III. La maggior parte dei ceppi codifica per ExoS (gruppo I) o ExoU (gruppo II) con diverse tossine associate, e ciò influisce sull'invasione delle cellule epiteliali e/o sulla citotossicità. Più recentemente è stato descritto il sistema di tipo VI (T6SS). Questo sistema funziona "pugnalandolo" altre cellule di *P. aeruginosa*, provocandone la morte, ed è stato proposto che venga utilizzato per la competizione intra-ceppo. *P. aeruginosa* produce anche una gamma di batteriocine chiamate piocine (tipi S, R e F), che uccidono altri ceppi sensibili di *P. aeruginosa* e si ritiene che siano anch'esse utilizzate per la competizione intra-ceppo.

7.8 Pili e Flagelli

I pili e i flagelli sono importanti per la motilità natatoria (swimming), a scatti (twitching) e a sciame (swarming), ma svolgono anche un ruolo nell'infezione. È stato dimostrato che i pili mediano l'adesione alle cellule epiteliali in coltura, e i mutanti di *P. aeruginosa* non pilati mostrano una virulenza ridotta rispetto ai loro ceppi parentali nei modelli animali di infezioni polmonari, intraperitoneali e della pelle ustionata. Si ritiene che il legame mediato dai pili alle superfici sia un primo passo fondamentale nella formazione del biofilm. È stato dimostrato che i flagelli sono importanti nel mediare l'adesione di *P. aeruginosa* alla mucina, una proteina glicosilata prodotta dai tessuti epiteliali ospiti e comunemente presente nell'espettorato della FC (fibrosi cistica). Anche i mutanti dei flagelli sono spesso compromessi nella virulenza nei modelli animali di infezione acuta.

7.9 Pompe di Efflusso RND

La famiglia delle pompe di efflusso RND (resistance-nodulation-cell division) è ampiamente diffusa nei batteri Gram-negativi. Ad oggi, in *P. aeruginosa* sono state identificate 12 pompe di efflusso RND. Quando espresse, le pompe RND conferiscono livelli clinicamente rilevanti di resistenza multifarmaco ed esportano una vasta gamma di substrati. Una delle pompe di efflusso RND meglio caratterizzate in *P. aeruginosa* è il sistema MexAB-OprM, che può contribuire alla resistenza a un'elevata resistenza antimicrobica nei biofilm. I veri ruoli biologici dei sistemi di efflusso devono ancora essere completamente elucidati.

8. Materiali e metodi

8.1 Criteri di Campionamento e Strutture Analizzate

Nel periodo compreso tra marzo e settembre 2023, è stata effettuata una raccolta di campioni di acqua potabile in 21 strutture sanitarie (12 localizzate nel territorio di Napoli, 7 nell'area di Caserta, 1 nella provincia di Salerno e 1 nell'area di Benevento) e in 26 contesti lavorativi (16 a Napoli, 5 a Caserta, 4 a Salerno e 1 a Benevento). Tutti i punti di prelievo erano ubicati nella regione Campania, nell'Italia meridionale. Complessivamente, sono stati recuperati 393 campioni, di cui 286 provenienti dagli ospedali e 107 dai luoghi di impiego/attività non sanitarie. Per ogni sessione di prelievo, il numero di campioni acquisiti variava da 3 a

15. La determinazione del numero di campioni si basava, per ciascun ospedale, sul numero di posti letto disponibili, sulle dimensioni complessive e sul numero di piani dell'edificio; per le strutture non ospedaliere, la scelta era fondata sulla superficie e sul numero di livelli.

Le strutture ospedaliere considerate in questa indagine eseguono routinariamente controlli microbiologici sulle risorse idriche e presentavano i seguenti tratti distintivi: presenza di un unico stabile (fatta eccezione per due), un intervallo di posti letto variabile tra 20 e 200, ed ospitavano pazienti ritenuti a elevato rischio (degenti nei reparti di medicina interna, pneumologia, geriatria, chirurgia, e affini). I prelievi d'acqua sono stati effettuati in sale operatorie, unità di terapia intensiva (UTIC), ambulatori per medicazioni, sale di day hospital e servizi igienici destinati ai degenti. L'acqua campionata al di fuori del contesto ospedaliero proveniva dai servizi igienici dei siti lavorativi. L'approvvigionamento idrico delle strutture sanitarie e di quelle non sanitarie deriva dalla rete idrica pubblica urbana. Il gestore della rete di distribuzione è responsabile dell'aggiunta di cloro libero come agente disinfettante per l'acqua potabile.

8.2 Protocollo di Raccolta e Trasporto dei Campioni

La fase di prelievo dei campioni e le sue successive analisi microbiologiche sono state condotte dal nostro personale tecnico di laboratorio. Il campionamento idrico dai rubinetti è stato eseguito in conformità con quanto specificato nella norma UNI EN ISO 19458:2006. In sintesi, 500 mL di acqua fredda sono stati raccolti in flaconi sterili di polietilene contenenti tiosolfato di sodio (per neutralizzare il disinfettante). I rubinetti sono stati sottoposti a sterilizzazione termica tramite fiamma prima dell'esecuzione del prelievo. L'acqua è stata lasciata defluire solo per il lasso di tempo necessario a dissipare ogni residuo termico, e successivamente è stata campionata. Ogni aliquota è stata etichettata in modo univoco su un registro di raccolta/foglio di calcolo al momento del prelievo. Tutti i campioni ottenuti sono stati trasferiti al laboratorio in contenitori termici a una temperatura controllata di $5\pm3^{\circ}\text{C}$ e analizzati entro 2 ore dal loro arrivo in sede.

8.3 Analisi Microbiologica

La ricerca di *P. aeruginosa* è stata effettuata in aderenza alla norma UNI EN ISO 16266:2008. Brevemente, 100 mL di acqua sono stati filtrati impiegando membrane filtranti in nitrato di cellulosa con una porosità di $0,45\mu\text{m}$ e un diametro di 47mm (fornite da Sartorius Stedim Biotech). Le membrane sono state trasferite su *Pseudomonas* Agar Base (Oxoid) integrato con *Pseudomonas* C-N Supplement e incubate a $36\pm2^{\circ}\text{C}$ per un periodo di 44 ± 4 ore. Tutte le colonie di aspetto blu/verde riconosciute come produttrici di piocianina sono state identificate come *P. aeruginosa*. La conferma dell'identità presuntiva di *P. aeruginosa* è avvenuta tramite il test dell'ossidasi, la coltura in brodo di acetamide e la valutazione della fluorescenza su terreno King's B. Un isolato confermato per ciascun campione esaminato è stato sottoposto ad analisi di spettrometria di massa a tempo di volo con desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice (MALDI-TOF MS) utilizzando il sistema MALDI Biotyper (Bruker Daltonik, Germania) e testato per la sensibilità agli antimicrobici.

8.4 Test di Suscettibilità Antimicrobica

La suscettibilità antimicrobica nei confronti di 20 composti è stata determinata mediante il protocollo di microdiluizione in brodo. Un aliquota di tre-cinque colonie di *P. aeruginosa* cresciute su piastre di agar nutriente (Microbiol, Cagliari, Italia) è stata raccolta e sospesa in una provetta contenente 5mL di acqua demineralizzata Sensititre (Thermo Fisher Scientific, Lenexa, KS) per raggiungere un'opacità finale equivalente a 0.5 McFarland (Biomerieux Italia, Firenze, Italia). Successivamente, 10 μL di ciascun inoculo sono stati trasferiti in una provetta contenente brodo Mueller-Hinton con aggiunta di cationi (SCAMHB) Sensititre (Thermo Fisher Scientific, Lenexa, KS). La sospensione dell'inoculo (50 μL) in SCAMHB è stata

distribuita in piastre per microtitolazione GN3F a 96 pozzetti con fondo a U (Thermo Fisher Scientific, Lenexa, KS) che contengono gli antimicrobici liofilizzati e diluiti in serie. In accordo con Sastre-Femenia et al., i farmaci antimicrobici testati comprendono agenti di prima scelta (classici): penicilline antipseudomonas con inibitori delle β -lattamasi (piperacillina/tazobactam), cefalosporine antipseudomonas (ceftazidime e cefepime), monobattami (aztreonam), carbapenemi antipseudomonas (meropenem) e fluorochinoloni (ciprofloxacina). I composti antimicrobici presenti nelle piastre Sensititre erano i seguenti: aminoglicosidi (amikacina (AMI) e gentamicina (GEN)); penicilline (ampicillina (AMP), ampicillina/sulbactam (A/S2), piperacillina/tazobactam (P/T4)); monobattami (aztreonam (AZT)); cefalosporine (cefazolina (FAZ), cefepime (FEP), ceftazidime (TAZ)); carbapenemi (meropenem (MERO) ed ertapenem (ETP)); fluorochinoloni (ciprofloxacina (CIP)), agenti diversi (trimetoprim-sulfametossazolo (SXT), tetracicline (tigeciclina (TGC) e tetraciclina (TET)). Come ceppi utilizzati per il controllo di qualità, sono stati adoperati *Escherichia coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Dopo l'incubazione a una temperatura controllata di 37°C per un intervallo di tempo di 20–24 ore, è stato impiegato un sistema automatizzato di lettura fluorimetrica delle piastre, Sensititre OptiRead (Thermo Fisher, Lenexa, KS), per determinare i valori della concentrazione minima inibitoria (MIC). L'interpretazione dei risultati MIC è stata eseguita in stretta osservanza delle linee guida EUCAST v. 14.0 per le specie di *Pseudomonas*. Nel caso in cui non fossero disponibili punti di interruzione (breakpoint) EUCAST specifici per le specie di *Pseudomonas*, i risultati sono stati interpretati assumendo come riferimento gli Enterobacterales. Il valore di MIC di ceftazidime e cefepime è stato desunto (o ricavato) in base alla sensibilità al cefuroxime, considerando 8 punti di interruzione di riferimento per gli enterobatteri. I dati derivanti dai test TET non sono stati considerati a causa della mancanza di un breakpoint clinico EUCAST aggiornato. Gli isolati che hanno dimostrato resistenza a ≥ 3 categorie di antimicrobici sono stati classificati come isolati MDR (Multi-Drug Resistant).

8.5 Sequenziamento Genomico Completo e Analisi Bioinformatica

Tutti gli isolati di *P. aeruginosa* sono stati sottoposti a estrazione del DNA. Le colture sono state fatte crescere *overnight* in agar nutritivo a una temperatura di 37±1 °C ed è stato utilizzato il DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germania) per eseguire l'estrazione del DNA su singole colonie, seguendo le istruzioni del produttore.

È stata utilizzata la chimica Nextera XT DNA (Illumina, San Diego, CA, USA) per eseguire la preparazione della libreria su 1 ng di DNA di ciascun campione, in accordo con i protocolli del produttore. La piattaforma NextSeq 500 (Illumina, San Diego, CA, USA) e il NextSeq 500/550 *mid output reagent cartridge* v2 (300 cicli, letture accoppiate standard da 150 bp) sono stati utilizzati per eseguire il sequenziamento dell'intero genoma (WGS).

Per l'analisi dei dati WGS, è stata utilizzata una *pipeline* interna, che includeva passaggi per il *trimming* mediante Trimmomatic v.0.36 e un controllo di qualità delle letture con FastQC v.0.11.5. È stato utilizzato SPAdes v.3.11.1 per eseguire l'assemblaggio *de novo* del genoma delle letture, e QUAST v.5.0.2 è stato utilizzato per eseguire il controllo di qualità dell'assemblaggio del genoma. Infine, gli strumenti Kraken2 e ConFindr sono stati utilizzati per eseguire controlli di contaminazione. È stata utilizzata la *pipeline* a riga di comando mlst v2.19 contro lo schema di *P. aeruginosa* ospitato dal database PubMLST per eseguire l'assegnazione del multi-locus sequence typing (MLST) sugli assemblaggi e per determinare i *sequence types* (STs). La presenza di geni di resistenza agli antimicrobici è stata verificata interrogando il database ResFinder 4.5.0 (consultato a febbraio 2024).

Trimmomatic v.0.36 e un controllo di integrità e purezza delle letture (quality check) con FastQC v.0.11.5. Per l'assemblaggio *de novo* del genoma a partire dalle letture grezze è stato utilizzato il software SPAdes v.3.11.1,

e per la verifica della qualità dell'assemblaggio del genoma è stato adoperato QUAST v.5.0.2. Infine, per la rilevazione di eventuali contaminazioni sono stati sfruttati gli strumenti Kraken2 e ConFindr.

Per l'attribuzione del tipo di sequenza multilocus (MLST) sugli assemblaggi e per la determinazione dei tipi di sequenza (STs), è stata impiegata la sequenza di operazioni (pipeline) da riga di comando mlst v2.19, confrontandola con lo schema specifico di *P. aeruginosa* custodito dal database PubMLST. La presenza di geni conferenti resistenza antimicrobica è stata accertata interrogando il database ResFinder 4.5.0 (ultima consultazione a febbraio 2024).

8.6 Affinità Tra gli Isolati di P. aeruginosa

L'analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) è stata condotta impiegando la sequenza di operazioni (pipeline) CFSAN e le sequenze di lettura sono state allineate (mapped) sul genoma di riferimento di *P. aeruginosa* PAO (NC_002516). Per la rappresentazione visiva dell'albero filogenetico a massima verosimiglianza (ML) ottenuto è stato utilizzato lo strumento Interactive Tree of Life (iTOL).

9. Risultati

9.1 Prevalenza di *P. aeruginosa* nei campioni d'acqua

P. aeruginosa è stato rilevato in 47 campioni su 393 (pari al 12.0%), di cui 26 raccolti dagli ospedali (9.1% dei 286 campioni) e 21 provenienti da strutture non ospedaliere (19.6% dei 107 campioni) (Tabella 1).

	Positive/Total samples	Ratio of positivity (%)
Hospitals	26/286	9.1
Non-hospitals	21/107	19.6
Total	47/393	12.0

Tabella 1. Totale dei campioni analizzati, campioni positivi e percentuale di campioni positivi nelle strutture ospedaliere e non ospedaliere.

In particolare, tra i 26 campioni positivi negli ospedali, 21 (80.8%) provenivano dall'area di Napoli, 1 (3.8%) dall'area di Caserta, 2 (7.7%) dall'area di Salerno e 2 (7.7%) dall'area di Benevento. Questi campioni positivi provenivano da diversi reparti ospedalieri: 1 di essi dalle sale di ostetricia, ortopedia, medicina d'urgenza, anestesia, neurologia, neurochirurgia, ingresso dell'acquedotto, cardiologia, ematologia, dialisi, ginecologia e nefrologia (3.8% per ciascuno), 2 dalle sale di odontoiatria, radiologia, chirurgia plastica e medicina generale (7.8% per ciascuno), 3 da pneumologia e chirurgia generale (11.6% per ciascuno). Dei 21 campioni positivi nelle strutture non ospedaliere, 18 (85.7%) campioni sono stati raccolti dall'area di Napoli e 3 (14.3%) dall'area di Caserta.

9.2 Profilo di Resistenza Antimicrobica

I risultati hanno mostrato che tutti i ceppi erano resistenti ad ampicillina e ampicillina/sulbactam e due erano resistenti a piperacillina-tazobactam. Per quanto riguarda gli aminoglicosidi, 11 dei 47 ceppi hanno mostrato resistenza alla gentamicina e solo un ceppo era resistente all'amikacina. Tutti i ceppi hanno mostrato resistenza alle cefalosporine di 1a (FAZ, CEP), 2a (FOX, FUR) generazione e a POD (3a generazione), 45 ceppi erano resistenti ad AXO (3a generazione) e sei erano resistenti a FEP (4a generazione) (Figura 1). È importante sottolineare che undici ceppi hanno mostrato resistenza a ertapenem, mentre 42 erano suscettibili a meropenem. Inoltre, circa sei ceppi hanno mostrato resistenza a ciprofloxacina e quattro ad aztreonam. Infine, 45 su 47 ceppi erano resistenti a tigeciclina.

Sedici dei 47 isolati erano MDR (multi-farmaco resistenti), dieci provenienti dagli ospedali e sei da ambienti non ospedalieri. Osservando in dettaglio le differenze tra gli ambienti clinici e non clinici, il numero più alto di ceppi resistenti ai carbapenemi (n=8) è stato rilevato in ambiente clinico. Al contrario, ciprofloxacina (n=4), aztreonam (n=4) e cefalosporine di 3a-4a generazione (n=7) sono risultati più frequenti al di fuori dell'ambiente clinico.

9.3 Dati genomici

Sono stati ottenuti con successo dati genomici di elevata qualità, come specificato nella Tabella Supplementare 3. Attraverso l'analisi MLST (Multi-Locus Sequence Typing), sono stati identificati in questo studio 13 distinti ST (Sequence Types), il che denota una popolazione microbica eterogenea.

Quattro ceppi isolati non mostravano corrispondenza con il database esistente e sono stati pertanto classificati come portatori di un nuovo ST (la totalità dei profili MLST è presentata nella Tabella Supplementare 2).

Cloni differenti sono stati rilevati in campioni prelevati sia all'interno che all'esterno del contesto ospedaliero, con l'unica eccezione di quattro ST (ST309, ST260, ST1203, ST253) che risultavano comuni a entrambi gli ambiti. L'ST 309 si è dimostrato essere il genotipo prevalente osservato in questo studio, individuato in 10 ceppi nell'ambiente clinico e 3 all'esterno.

L'analisi SNP (Polimorfismo a Singolo Nucleotide) ha evidenziato che gli isolati di *P.aeruginosa* ST309 presentavano una stretta correlazione reciproca (variazione di SNP: 1–92, media: 59, mediana: 70), strutturati in tre cluster distinti (Figura 1).

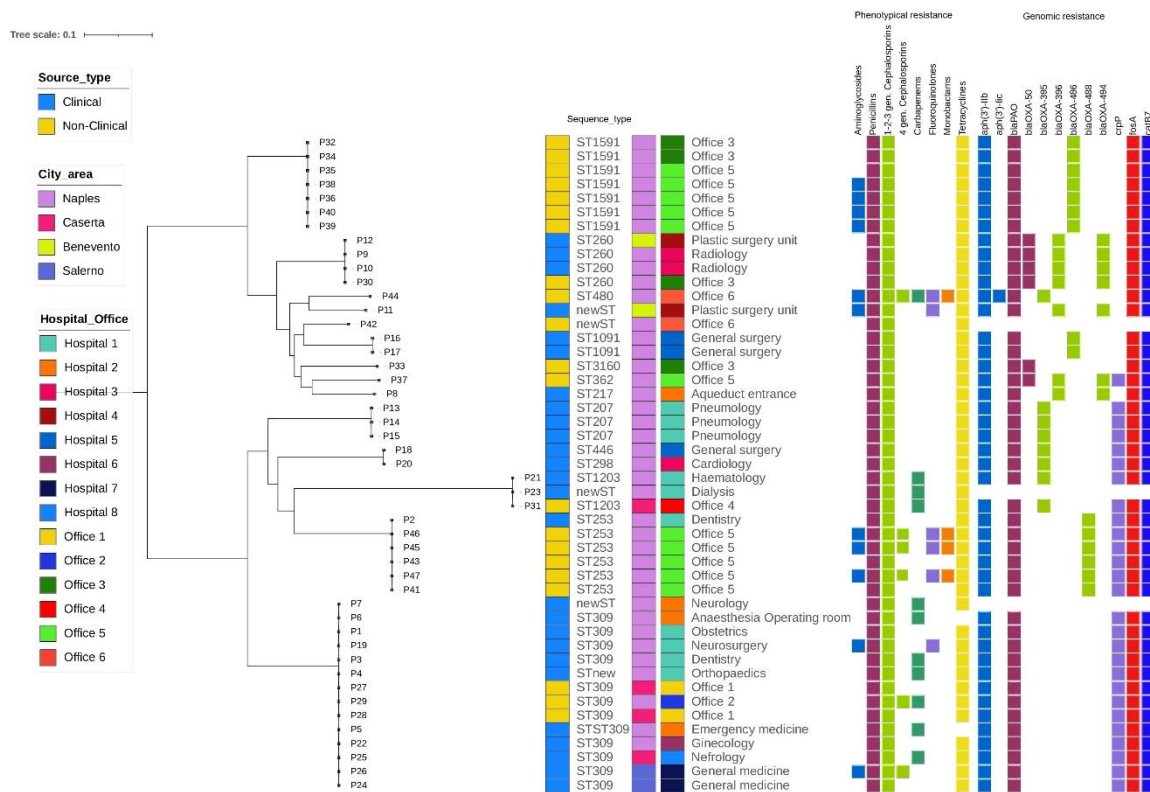


Figura 1. Albero di massima verosimiglianza (ML) con radice al punto medio, ottenuto dalla *pipeline* CFSAN.

Il primo strato rappresenta la fonte di isolamento di *P. aeruginosa*, il secondo strato indica la città e il terzo l'ospedale o l'ufficio da cui sono stati rilevati gli isolati di *P. aeruginosa*, come mostrato nella legenda. È visualizzata la caratterizzazione delle resistenze antimicrobiche fenotipiche e genomiche (da sinistra a destra): aminoglicosidi (azzurro), penicilline (magenta), cefalosporine (verde chiaro), carbapenemi (verde), fluorochinoloni (viola), monobattami (arancione), tetracicline (giallo), fosfomicina (rosso) e fenicoli (blu).

Un primo cluster ha mostrato una forte correlazione (SNP=1) tra due isolati di *P. aeruginosa* ST309 rilevati nell'Ospedale 1 di Napoli nei reparti di ostetricia e neurochirurgia. Tre isolati ST309 strettamente correlati tra

loro (SNPs=7) sono stati rilevati in ambienti non clinici e in date di campionamento diverse. È importante sottolineare che nel cluster di ceppi ST260 (variazione di SNPs: 0-5, media: 2, mediana: 1) sono stati rilevati un ceppo dalla radiologia dell'Ospedale 3 a Napoli e un ceppo dall'unità di chirurgia plastica dell'Ospedale 4 a Benevento. Allo stesso tempo, i ceppi ST260 provenienti dall'ambiente clinico erano correlati a un ceppo dall'Ufficio 3 a Napoli. Inoltre, l'analisi SNP ha mostrato una correlazione tra ceppi ST253 (variazione di SNPs: 0-16, media: 5, mediana: 2), in particolare un ceppo clinico dell'Ospedale 1 nel reparto di odontoiatria si è raggruppato insieme a quelli isolati (SNPs=14), 4 mesi dopo, dall'ambiente (Ufficio 5 a Napoli). Infine, i ceppi ST1203 dal reparto di ematologia dell'Ospedale 1 a Napoli si sono raggruppati insieme a un isolato dall'Ufficio 4 a Caserta.

La maggior parte degli isolati (44 su 47) presentava determinanti di resistenza (Supplementary Table 2), i più comuni dei quali erano il gene ossacillinasi di origine naturale blaOXA-50 e il gene cefalosporinasi cromosomale blaPAO, così come i geni di resistenza agli aminoglicosidi (aph(3')-IIb), al cloramfenicolo (catB7) e alla fosfomicina (fosA) (Figura 1). Inoltre, ventisette dei 47 ceppi avevano acquisito i geni di resistenza crpP associati alla resistenza alla ciprofloxacina. Sono stati evidenziati anche molti determinanti aggiuntivi di resistenza ai β -lattamici, come blaOXA-395, blaOXA-396, blaOXA-486, blaOXA-488, blaOXA-494 in 30 dei 47 isolati.

10 CONCLUSIONI

Il presente studio offre un quadro della situazione ambientale relativa alla contaminazione delle risorse idriche nella regione Campania, Italia. La ricerca ha confermato che la presenza di *P. aeruginosa*, in particolare quella caratterizzata da resistenza agli antibiotici, costituisce una minaccia significativa per la salute pubblica.

Risultati Principali e Implicazioni Epidemiologiche

L'indagine ha riscontrato la presenza di *P. aeruginosa* nel 12,0% dei campioni d'acqua analizzati, provenienti sia da strutture ospedaliere che non ospedaliere. Questa percentuale sottolinea la necessità critica di un monitoraggio ambientale rigoroso in tutti i luoghi che accolgono popolazioni vulnerabili (come pazienti, anziani o bambini).

Un dato cruciale emerso dallo studio è la rilevazione dello stesso clone di *P. aeruginosa* in diverse strutture. Questo suggerisce un'ampia diffusione e una potenziale colonizzazione condivisa tra le varie reti idriche (pipelines). Inoltre, alcuni degli isolati ambientali appartengono a cloni precedentemente documentati in contesti clinici.

Tale evidenza impone l'indagine sistematica della presenza di *P. aeruginosa* nell'ambiente ospedaliero per:

1. Identificare tempestivamente i ceppi.
2. Applicare immediatamente procedure di decontaminazione.
3. Controllare efficacemente la diffusione del patogeno.

10.1 Raccomandazioni per la Prevenzione e la Sicurezza Idrica

I risultati ottenuti evidenziano la necessità di una revisione e implementazione urgente dei protocolli di controllo:

- Controlli di Routine: È indispensabile implementare controlli di routine per l'indagine dei microrganismi negli ambienti a rischio.
- Gestione Ambientale: Per inibire la diffusione del batterio è fondamentale:
 - Monitorare i fattori favorevoli alla crescita, come la formazione di biofilm all'interno delle condutture.
 - Adottare metodi di filtrazione terminale dell'acqua (ovvero al punto d'uso).
 - Implementare Piani di Sicurezza Idrica (Water Safety Plans) a livello di singola struttura, assicurando un approccio proattivo e globale alla gestione del rischio idrico.
- Sorveglianza Ampliata: L'esecuzione regolare di tale monitoraggio è essenziale per la prevenzione delle infezioni umane. Si raccomanda, inoltre, di estendere questa sorveglianza ad altri microrganismi che possono rappresentare una minaccia per la salute pubblica.

11 DISCUSSIONE

Il lavoro ha avuto i seguenti obiettivi principali: monitorare la presenza di *P. aeruginosa* nell'acqua, caratterizzare i ceppi a livello genomico e valutarne il profilo di suscettibilità antimicrobica (AMR).

Lo studio effettuato evidenzia come i sistemi idrici contaminati siano una fonte significativa di microrganismi, esponendo a rischio di infezione soprattutto gli individui fragili in contesti come gli ospedali. L'importanza del problema AMR è stata introdotta sottolineando come il successo iniziale degli antibiotici sia stato messo in discussione dall'emergere della resistenza batterica, rendendo il controllo preventivo del sistema idrico un passo essenziale per la salute pubblica.

11.1 Prevalenza di *P. aeruginosa* nei Campioni Idrici

Lo studio ha rilevato una percentuale di positività del 12,0% (47 campioni positivi su 393 totali), un dato superiore a quanto riscontrato in diverse indagini precedenti condotte in Italia e all'estero, che riportano valori generalmente inferiori al 5%:

- Studi precedenti in Italia: Rilevazione del 2,38% in cliniche dentali (rif. 43) e del 2,07% in acque fredde e calde in Liguria (rif. 44). Nello studio ligure, i campioni positivi provenivano in maggioranza dall'acqua fredda (68 su 93).
- Studi internazionali: Cholley et al. hanno riportato una prevalenza del 4,5% nelle acque fredde di rubinetti in ICU (rif. 45).
- Studi con alta prevalenza: L'indagine di De Giglio et al. in un ospedale universitario pugliese ha rilevato un'alta positività (46,3%) nell'acqua di rubinetto (rif. 46).

11.2 Diversità Genomica e Cloni a Rischio

I risultati hanno mostrato una elevata diversità genetica tra i ceppi di *P. aeruginosa* isolati.

- Il clone più prevalente è risultato essere lo ST 309.
- Gli isolati non erano correlati ai principali ST epidemici mondiali (ST235, ST111, ST175, ST395).
- È stata identificata la presenza del clone ad alto rischio ST298 in contesti clinici (rif. 47).
- Lo ST309 è stato proposto da altri autori per l'inclusione tra i cloni ad alto rischio a causa della sua diffusione globale, della sua virulenza e della capacità di sviluppare resistenza antimicrobica, produrre biofilm e persistere nell'ambiente. Tale clone è stato isolato negli ospedali dello studio anche in reparti critici (medicina d'emergenza, ICU) e in diverse città della regione (Napoli, Caserta, Salerno).
- Un altro clone identificato, lo ST253, è stato riscontrato sia in ambienti clinici che esterni agli ospedali, in linea con osservazioni precedenti che lo isolano da infezioni umane acute e croniche (rif. 48).

11.3 Correlazione Tra Isolati e Persistenza

L'analisi genetica ha fornito evidenze di trasmissione e persistenza ambientale:

- L'analisi SNP ha mostrato la presenza di alcuni isolati dello stesso clone in reparti differenti della stessa struttura sanitaria (es. ostetricia e neurochirurgia) e la presenza dello stesso clone in ospedali e aree geografiche diverse (Napoli e Benevento), suggerendo una diffusione inter-struttura.
- La presenza dello stesso ST in ceppi prelevati nella stessa struttura e nello stesso giorno di campionamento è stata interpretata come possibile conseguenza della colonizzazione della rete idrica (pipeline) interna all'edificio.
- Il recupero dello stesso clone a distanza di mesi dalla prima isolamento suggerisce la persistenza del ceppo nell'ambiente.

11.4 Profilo di Resistenza Antimicrobica (AMR)

11.4.1 Resistenza Fenotipica

I risultati sull'AMR sono stati confrontati con studi precedenti:

- Studi precedenti: Schiavano et al. hanno trovato il 9,43% di campioni positivi resistenti all'imipenem (rif. 50). Vaz-Moreira et al. hanno rilevato la maggiore resistenza a ticarcillina, ticarcillina + acido clavulanico, fosfomicina e cotrimoxazolo, ma nessuna resistenza ai farmaci di prima linea come levofloxacina, piperacillina, ciprofloxacina e carbapenemi (rif. 51).
- Trend Storico: Dal 2017 al 2022 è stata osservata una continua diminuzione della resistenza agli aminoglicosidi e ai fluorochinoloni, e più recentemente ai carbapenemi (rif. 52). Nel 2022, le resistenze più alte si registravano per piperacillina-tazobactam (24,1%) e ceftazidime (19,0%).
- Risultati dello Studio: Lo studio ha mostrato un andamento AMR simile a quello osservato negli anni 2017-2022. Alcuni ceppi erano resistenti a aztreonam, ciprofloxacina e aminoglicosidi, che sono importanti agenti anti-pseudomonas. Il numero maggiore di ceppi resistenti ai carbapenemi è stato isolato in ambito clinico, mentre la resistenza agli antimicrobici di prima linea (ciprofloxacina, aztreonam, ceftazidime, cefepime) era più frequente nell'ambiente extra-clinico. È stata inoltre accertata la presenza di ceppi MDR (Multi-Drug Resistant).

11.4.2 Caratteristiche Genomiche della Resistenza

I ceppi isolati ospitavano i seguenti geni di resistenza di interesse:

- Geni intrinseci: blaOXA-50 (ossacillinasasi naturale) e blaPAO (cefalosporinasasi cromosomale).
- Geni di resistenza acquisita: aph(3')-IIb (aminoglicosidi), fosA (fosfomicina) e catB7 (cloramfenicolo).
- Resistenza ai Fluorochinoloni: Nella maggior parte dei ceppi è stato riscontrato il gene crpP, che codifica un meccanismo di fosforilazione enzimatica che riduce la suscettibilità alla ciprofloxacina (rif. 53).
- Resistenza ai Carbapenemi: Sono state trovate in alcuni isolati diverse varianti della carbapenemasi della famiglia OXA-50 (blaOXA-395, blaOXA-396, blaOXA-486, blaOXA-488, blaOXA-494), che potrebbero spiegare gli elevati valori di MIC per l'ertapenem in alcuni ceppi.

11.5 Implicazioni

La presenza di *P. aeruginosa* resistente agli antibiotici nelle reti idriche pubbliche e negli ambienti sanitari pone rischi potenziali per la salute, in particolare per la popolazione vulnerabile (immunocompromessi, bambini, anziani, donne in gravidanza), con conseguenze quali complicazioni in terapia intensiva e aumento dei costi sanitari. L'acqua ospedaliera è confermata come una fonte significativa di infezione.

Le Linee Guida OMS 2022 raccomandano cautela sulla presenza del microrganismo nelle strutture sanitarie (rif. 57), suggerendo l'inclusione del monitoraggio di *P. aeruginosa* nei piani di sicurezza dell'acqua (water safety plans). I risultati dello studio sottolineano l'importanza del monitoraggio ambientale che dovrebbe includere l'indagine non solo del patogeno, ma anche del pannello di resistenze agli antibiotici in un'ottica di routine sia in strutture ospedaliere che non ospedaliere.

11.6 Limitazioni dello Studio

Il lavoro presenta alcune limitazioni riconosciute:

1. Mancanza di confronto clinico: Assenza di un confronto diretto tra i dati degli isolati ambientali e i dati clinici dei pazienti ricoverati (auspicabile in studi futuri).
2. Dati quantitativi: Non è stata considerata l'influenza di parametri quantitativi come il cloro residuo o la temperatura dell'acqua al momento del campionamento, variabili che possono influenzare la contaminazione.
3. Ambito Geografico: Lo studio rappresenta un'istantanea di una limitata area regionale; è necessario raccogliere dati a livello nazionale.

Per mitigare i rischi è necessaria l'adozione di un monitoraggio attivo delle infezioni, procedure di sanificazione e test sistematici dell'acqua in punti significativi del sistema idrico ospedaliero. Si ribadisce, infine, la necessità di affrontare anche l'aspetto della minimizzazione dello spreco idrico e dell'impatto ambientale (rif. 55, 56).

Bibliografia

- LaBauve AE, Wargo MJ. Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protoc Microbiol*. 2012;25(1),6E-1. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc06e01s25>
- Urgancı NN, Yılmaz N, Alaşalvar GK, Yıldırım Z. *Pseudomonas aeruginosa* and its pathogenicity. *TURJAF*. 2022;10(4),726-738. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v10i4.726-738.4986>
- Mena KD, Gerba CP. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2009;Vol 201,71-115. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0032-6_3
- Wang X, Wang J, Liu SY, et al. Mechanisms of survival mediated by the stringent response in *Pseudomonas aeruginosa* under environmental stress in drinking water systems: Nitrogen deficiency and bacterial competition. *J Hazard Mater*. 2023;448,130941. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.130941>
- Hafiz TA, Bin Essa EA, Alharbi SR, et al. Epidemiological, microbiological, and clinical characteristics of multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in King Fahad Medical City, Riyadh, Saudi Arabia. *Trop Med Infect Dis*. 2023;8(4),205. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8040205>
- Tuon FF, Dantas LR, Suss PH, Tasca Ribeiro VS. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: a review. *Pathogens*. 2022;11(3)300. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030300>
- Norbury W, Herndon DN, Tanksley J, Jeschke MG, Finnerty CC, Scientific Study Committee of the Surgical Infection Society. Infection in burns. *Surg Infect*. 2016;17(2),250-255. <https://doi.org/10.1089/sur.2013.134>
- D'Andrea F, Paolucci IA, Ceccarelli M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* detection in South Italy: an epidemiological survey. *Infect Dis Trop Med*. 2018;4(4),e507. https://www.researchgate.net/profile/Francesco-Daleo4/publication/329738220_Pseudomonas_aeruginosa_detection_in_South_Italy_an_epidemiological_survey/links/5c18cd5a4585157ac1ca5439/Pseudomonas-aeruginosa-detection-in-South-Italy-an-epidemiological-survey.pdf
- Taudien S, Leszczynski W, Mayer T, et al. Misidentification as *Pseudomonas aeruginosa* in hospital water supply samples. *J Hospit Infect*. 2023;133,23-27. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2022.12.013>
- Cervia JS, Ortolano GA, Canonica FP. Hospital tap water: A reservoir of risk for health care-associated infection. *Infect Dis Clin Pract*. 2008;16(6),349-353. <https://doi.org/10.1097/IPC.0b013e318181fa5e>
- Torre I, Diana MV, Iervolino C, et al. Legionella contamination in hospitals of the Campania region: Five years of environmental surveillance results. *Ann Ig*. 2014;26(1),89-96. <https://doi.org/10.7416/ai.2014.1961>
- Laganà P, Facciola A, Palermo R, Delia S. Environmental surveillance of legionellosis within an Italian university hospital—results of 15 years of analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(7),1103. <https://doi.org/10.3390/ijerph16071103>
- Vincenti S, De Waure C, Raponi M, et al. Environmental surveillance of *Legionella* spp. colonization in the water system of a large academic hospital: Analysis of the four-year results on the effectiveness of the chlorine dioxide disinfection method. *Sci Total Environ*. 2019;657,248-253. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.036>

- Lombardi A, Borriello T, De Rosa E, et al. Environmental Monitoring of Legionella in Hospitals in the Campania Region: A 5-Year Study. *Int J Environ Res Public Health*. 2023;20(8),5526. <https://doi.org/10.3390/ijerph20085526>
- Ali G, Mijwil MM, Adamopoulos I, Buruga BA, Gök M, Sallam M. Harnessing the potential of artificial intelligence in managing viral hepatitis. *MJBD*. 2024, 128-163. <https://doi.org/10.58496/mjbd/2024/010>
- Oliver A, Rojo-Molinero E, Arca-Suarez J, et al. Pseudomonas aeruginosa antimicrobial susceptibility profiles, resistance mechanisms and international clonal lineages: update from ESGARS-ESCMID/ISARPAE Group. *Clin Microbiol Infect*. 2024;30(4),469-480. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.12.026>
- Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023 - 2021 data. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control and World Health Organization. 2023. Accessed 6 Oct 2024. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2023-2021-data#:~:text=In%202021,%20percentages%20below%2010%%20were>
- Capatina D, Feier B, Hosu O, Tertis M, Cristea C. Analytical methods for the characterization and diagnosis of infection with Pseudomonas aeruginosa: A critical review. *Anal Chim Acta*. 2022;1204,339696. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339696>
- Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. 2019;37(1),177-192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
- Horcajada JP, Montero M, Oliver A, et al. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant Pseudomonas aeruginosa infections. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(4),10-1128. <https://doi.org/10.1128/cmr.00031-19>
- Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa in health care facilities. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO". 2017. Accessed 6 Oct 2024. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/259462/9789241550178-eng.pdf?sequence=1>
- RAPPORTO 2022 SULL'ANTIBIOTICO RESISTENZA RILEVATI NELLE STRUTTURE PUBBLICHE DEL SISTEMA SANITARIO DELLA CAMPANIA RILEVATI NELLE STRUTTURE PUBBLICHE DEL SISTEMA SANITARIO DELLA CAMPANIA. <https://www.regione.campania.it/assets/documents/rapporto-sirear-2022-con-isbn.pdf>
- Kinsey CB, Koirala S, Solomon B, et al. Pseudomonas aeruginosa outbreak in a neonatal intensive care unit attributed to hospital tap water. *ICHE*. 2017;38(7), 801-808. <https://doi.org/10.1017/ice.2017.87>
- Weng MK, Brooks RB, Glowicz J, et al. Outbreak investigation of Pseudomonas aeruginosa infections in a neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control*. 2019;47(9), 1148-1150. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2019.03.009>
- UNI EN ISO 19458:2006. Qualità dell'acqua - Campionamento per analisi microbiologiche. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 2006.
- UNI EN ISO 16266:2008. Qualità dell'acqua - Ricerca e conta di Pseudomonas aeruginosa - Metodo per filtrazione su membrana. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland. 2008.

- Sastre-Femenia MÀ, Fernández-Muñoz A, Gomis-Font MA, et al. *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic susceptibility profiles, genomic epidemiology and resistance mechanisms: a nation-wide five-year time lapse analysis. *Lancet Reg Health Eur.* 2023;34. <https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2023.100736>
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0. 2024. Accessed 9 Sep 2024 <http://www.eucast.org>
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3),268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Cornacchia A, Chiaverini A, Centorotola G, et al. Whole-genome sequences of two *Klebsiella pneumoniae* strains (sequence types 23 and 35) from wildlife. *Microbiol Resour Announc.* 2022;11(6),e00140-22. <https://doi.org/10.1128/mra.00140-22>
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15),2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. <https://www.scienceopen.com/document?vid=bfd1b738-d18e-4784-b866-c43fa835b120>
- Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Korobeynikov A. Using SPAdes de novo assembler. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2020;70(1),e102. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* 2013;29(8),1072-1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Wood DE, Lu J, Langmead B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol.* 2019 Nov 28;20(1):257. doi: 10.1186/s13059-019-1891-0. PMID: 31779668; PMCID: PMC6883579.
- Low AJ, Koziol AG, Manninger PA, Blais B, Carrillo CD. ConFindr: rapid detection of intraspecies and cross-species contamination in bacterial whole-genome sequence data. *PeerJ.* 2019 May 31;7:e6995. doi: 10.7717/peerj.6995. PMID: 31183253; PMCID: PMC6546082.
- Seemann, T. (2013). mlst. Accessed 15 Sep 2021. <https://github.com/tseemann/mlst>
- Jolley KA, Chan MS, Maiden, MCJ. MlstdbNet—distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. *BMC Bioinformatics.* 2004;5:86. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-5-86>
- Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemot.* 2020;75(12),3491-3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics.* 2009;10,1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Davis S, Pettengill JB, Luo Y, et al. CFSAN SNP Pipeline: an automated method for constructing SNP matrices from next-generation sequence data. *PeerJ Comput Sci.* 2015;1:e20. <https://doi.org/10.7717/peerj-cs.20>
- Hussein ZA, Talib ZA. Study the bacterial resistance of antibiotic from opportunistic bacteria. *Shifaa*, 2024, 63-79. <https://doi.org/10.70470/shifaa/2024/008>
- Pasquarella C, Veronesi L, Napoli C, et al. Microbial environmental contamination in Italian dental clinics: A multicenter study yielding recommendations for standardized sampling methods and threshold values. *Sci Total Environ.* 2012;420,289-299. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.01.030>

- Cristina ML, Sartini M, Schinca E, Ottria G, Casini B, Spagnolo AM. Evaluation of multidrug-resistant *P. aeruginosa* in healthcare facility water systems. *Antibiotics*. 2021;10(12),1500. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121500>
- Cholley P, Thouverez M, Floret N, Bertrand X, Talon D. The role of water fittings in intensive care rooms as reservoirs for the colonization of patients with *Pseudomonas aeruginosa*. *Intensive Care Med*. 2008;34,1428-1433. <https://doi.org/10.1007/s00134-008-1110-z>
- De Giglio O, Diella G, Lopuzzo M, et al. Management of microbiological contamination of the water network of a newly built hospital pavilion. *Pathogens*. 2021;10(1),75. <https://doi.org/10.3390/pathogens10010075>
- del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Oliver A. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally-acquired β -lactamases: 2020 update. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;56(6),106196. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106196>
- Fischer S, Dethlefsen S, Klockgether J, Tümmler B. Phenotypic and genomic comparison of the two most common ExoU-positive *Pseudomonas aeruginosa* clones, PA14 and ST235. *MSystems*. 2020;5(6),10-1128. <https://doi.org/10.1128/msystems.01007-20>
- Magalhães B, Valot B, Abdelbary MM, et al. Combining standard molecular typing and whole genome sequencing to investigate *Pseudomonas aeruginosa* epidemiology in intensive care units. *Front Public Health*. 2020;8,3. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00003>
- Schiavano GF, Carloni E, Andreoni F, et al. Prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in water samples in central Italy and molecular characterization of opr D in imipenem resistant isolates. *PLoS One*. 2017;12(12),e0189172. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189172>
- Vaz-Moreira I, Nunes OC, Manaia CM. Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from drinking water. *Sci Total Environ*. 2012;426,366-374. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.046>
- AR-ISS: sorveglianza nazionale dell'Antibiotico-Resistenza. Dati 2022. Istituto Superiore di Sanità. 2023. https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/ar-iss/RIS-4_2023.pdf
- Chávez-Jacobo VM, Hernández-Ramírez KC, Silva-Sánchez J, et al. Prevalence of the *crpP* gene conferring decreased ciprofloxacin susceptibility in enterobacterial clinical isolates from Mexican hospitals. *J Antimicrob Chemot*. 2019;74(5),1253-1259. <https://doi.org/10.1093/jac/dky562>
- Monserrat-Martinez A, Gambin Y, Sierrecki E. Thinking outside the bug: molecular targets and strategies to overcome antibiotic resistance. *Int J Mol Sci*. 2019, 20(6), 1255. <https://doi.org/10.3390/ijms20061255>
- Saleh A, Saleh N, Ali O, Hasan R, Ahmed O, Alias A, Yassin K. Green building techniques: under the umbrella of the climate framework agreement. *BJML*. 2024, 1-14. <https://doi.org/10.58496/bjml/2024/001>
- Dulaimi AAMA. The Principles of Urban Design-Hammarby, Siostad, Stockholm. *MJCE*. 2023, 44-49. <https://doi.org/10.58496/mjce/2023/006>
- WHO. Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first and second addenda. Geneva: World Health Organization; 2022. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/352532/9789240045064-eng.pdf?sequence=1>

INDICE

Capitolo VI: Contesto	pag. 19
Capitolo VII: Introduzione	pag. 19
Paragrafo 7.1: Scoperta ed Etimologia	pag 20
Paragrafo 7.2: Rischio Clinico e Resistenza	pag 20
Paragrafo 7.3: Filogenesi	pag 22
Paragrafo 7.4: Genoma ed Evoluzione	pag 22
Paragrafo 7.5: Caratteristiche chiave e Scoperte	pag 23
Paragrafo 7.6: Quorum Sensing e Cheating Sociale	pag 24
Paragrafo 7.7: Esoprodotti e Metaboliti Secondari	pag 24
Paragrafo 7.8: Pili e Flagelli	pag 25
Paragrafo 7.9: Pompe di Efflusso RND	pag 25
 Capitolo VIII: Materiali e Metodi	 pag 25
Paragrafo 8.1: Criteri di Campionamento e Strutture Analizzate	pag 25
Paragrafo 8.2: Protocollo di Raccolta e Trasporto dei Campioni	pag 26
Paragrafo 8.3: Analisi Microbiologica	pag 26
Paragrafo 8.4: Test di Suscettibilità Antimicrobica	pag 26
Paragrafo 8.5: Sequenziamento Genico Completo e Analisi Bioinformatica	pag 27
Paragrafo 8.6: Affinità tra gli Isolati di <i>P. aeruginosa</i>	pag 28
 Capitolo IX: Risultati	 pag. 29
Paragrafo 9.1: Prevalenza di <i>P. aeruginosa</i> nei campioni d'acqua	pag 29
Paragrafo 9.2: Profilo di Resistenza Antimicrobica	pag 29
Paragrafo 9.3: Dati Genomici	pag 30
 Capitolo X: Conclusioni	 pag. 31
Paragrafo 10.1: Raccomandazioni per la Prevenzione e la Sicurezza Idrica	pag 31
 Capitolo XI: Discussione	 pag. 33
Paragrafo 11.1: Prevalenza di <i>P. aeruginosa</i> nei Campioni Idrici	pag 33
Paragrafo 11.2: Diversità Genomica e Cloni a Rischio	pag 33
Paragrafo 11.3 Correlazione tra Isolati e Persistenza	pag 33
Paragrafo 11.4: Profilo di Resistenza Antimicrobica	pag 34
Paragrafo 11.4.1 Resistenza Fenotipica	pag 34
Paragrafo 11.4.2 Caratteristiche Genomiche della Resistenza	pag 34
Paragrafo 11.5: Implicazioni	pag. 35
Paragrafo 11.6 Limitazioni dello Studio	pag. 35
 Bibliografia	 pag. 36