

Strategie di monitoraggio dell'inquinamento di origine biologica dell'aria in ambienti indoor

Bonadonna L., Briancesco R., Coccia A.M., Della Libera S., Gucci P.M.B., Lacchetti I., La Rosa G., Meloni P., Paradiso R., Semproni M., Fuselli S.
Istituto Superiore di Sanità - Dipartimento di Ambiente e connessa Prevenzione Primaria

Brunetto B., Iacovacci P., Pini C.
Istituto Superiore di Sanità - Centro per la Ricerca e la Valutazione dei prodotti immunobiologici

De Gironimo V.
Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale
per il Gruppo di Studio Nazionale sull'Inquinamento Indoor

1. INTRODUZIONE.....	4
2. AMBIENTI <i>INDOOR</i> : INQUINAMENTO BIOLOGICO.....	5
Caratteristiche del bioaerosol.....	5
3. RIFERIMENTI NORMATIVI E LINEE GUIDA.....	7
4. ALLERGENI NEGLI AMBIENTI <i>INDOOR</i>	9
5. ORGANISMI NEGLI AMBIENTI <i>INDOOR</i>	13
Batteri.....	13
Protozoi.....	21
Alghe e cianobatteri.....	218
Funghi.....	218
6. VIRUS NEGLI AMBIENTI <i>INDOOR</i>	20
7. TOSSINE NEGLI AMBIENTI <i>INDOOR</i>	24
Endotossine batteriche.....	24
Micotossine.....	26
8. EFFETTI SULLA SALUTE UMANA.....	327
Quadri morbosi di carattere infettivo.....	368
Quadri morbosi di natura allergica.....	30
9. INDICI DI CONTAMINAZIONE MICROBICA.....	32
Parametri microbiologici.....	33
10. CRITERI DI CAMPIONAMENTO.....	35
Tecniche di campionamento e analisi.....	35
Campionamento passivo.....	456
Campionamento attivo.....	457
11. CAMPIONAMENTO DALL'ARIA.....	478
Campionamento dei virus.....	42
Campionamento degli allergeni.....	43
Campionamento delle endotossine batteriche.....	575
12. CAMPIONAMENTO DALLE SUPERFICI.....	598
Tecnica delle piastre a contatto.....	609
Tecnica dei tamponi.....	50
Virus.....	51

Allergeni	51
13. METODI DI ANALISI.....	54
Batteri e Funghi	55
Virus.....	60
Allergeni	61
Endotossine batteriche	64

DRAFT

Il Gruppo di Studio Nazionale sull'Inquinamento *Indoor* dell'ISS è stato costituito con nota del 1° ottobre 2010 (Prot. PRE620/10 COR-M) dal Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità, Prof. Enrico Garaci. Di seguito l'elenco dei componenti:

Massimo Berico	<i>Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile</i>
Vincenza Bianchimani	<i>Regione Toscana</i>
Salvatore Bongiorno	<i>Regione Valle d'Aosta</i>
Bruno Bove	<i>Regione Basilicata</i>
Silvia Brini	<i>Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale</i>
Giuseppe Caredda	<i>Regione Sardegna</i>
Angelo Cecinato	<i>Consiglio Nazionale delle Ricerche</i>
Daniela Cimini	<i>Regione Marche</i>
Alessandro Cipriani	<i>Regione Valle d'Aosta</i>
Fabrizio Cumo	<i>Sapienza Università di Roma</i>
Annamaria de Martino	<i>Ministero della Salute</i>
Maria delle Salette Mattiacci	<i>Regione Lazio</i>
Francesco Iacono	<i>Regione Sicilia</i>
Raimondo Ibba	<i>Regione Sardegna</i>
Paolo Izzo	<i>Istituto Superiore di Sanità</i>
Rosanna La Vecchia	<i>Regione Toscana</i>
Rosanna Mabilia	<i>Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca</i>
Salvatore Minardi	<i>Regione Sicilia</i>
Marinella Natali	<i>Regione Emilia-Romagna</i>
Angelo Pellegrino	<i>Regione Piemonte</i>
Enrico Procopio	<i>Regione Piemonte</i>
Federica Rossi Gasparini	<i>Associazione DonnEuropee Fedrecasalinghe</i>
Anna Santarsiero	<i>Istituto Superiore di Sanità</i>
Genesio Scaloni	<i>Regione Marche</i>
Gaetano Settimo	<i>Istituto Superiore di Sanità</i>
Luigi Turrio Baldassarri	<i>Istituto Superiore di Sanità</i>
Massimo Valsecchi	<i>Regione Veneto</i>
Antonella Pillozzi	<i>Segreteria Organizzativa, Istituto Superiore di Sanità</i>
Sergio Fuselli	<i>Coordinatore del Gruppo, Istituto Superiore di Sanità</i>
Gruppo ad hoc di esperti:	
Lucia Bonadonna	
Rossella Briancesco	
Barbara Brunetto	
Anna Maria Coccia	
Vincenzo De Gironimo	
Simonetta Della Libera	
Paola, Margherita Bianca Gucci	
Patrizia Iacovacci	
Giuseppina La Rosa	
Pierluigi Meloni	
Ines Lacchetti	
Rosa Paradiso	
Carlo Pini	
Maurizio Semproni	

Per eventuali osservazioni rivolgersi al seguente indirizzo di posta: lucia.bonadonna@iss.it

1. INTRODUZIONE

L'inquinamento dell'aria *indoor* interessa l'aria degli ambienti confinati, cioè quella presente nei luoghi all'interno dei quali si svolgono attività umane, sia di lavoro non industriale, sia conviviali, di svago o di riposo. Al contrario di quanto succede negli ambienti di lavoro, nel caso di abitazioni, scuole, uffici, edifici pubblici, mezzi di trasporto, ecc., l'inquinamento *indoor* viene frequentemente sottovalutato per fattori di natura culturale, psicologica o storica.

In realtà, diverse ricerche hanno dimostrato che in questi luoghi l'esposizione ad inquinanti di varia natura può essere addirittura superiore a quella degli inquinanti in ambienti *outdoor* o industriali.

Infatti, negli anni più recenti, è stato segnalato un aumento di problemi sanitari legati alla *Indoor Air Quality* (IAQ) correlabile anche a nuovi stili di vita. Infatti, ad esempio, misure di risparmio energetico, per una maggior efficienza dei serramenti, possono produrre scarso ricambio d'aria, come anche, sistemi di climatizzazione possono ricircolare aria eventualmente contaminata negli ambienti (3). In questi casi, una cattiva manutenzione o una errata progettazione degli impianti può portare all'accidentale contaminazione degli ambienti (2).

La qualità dell'aria *indoor* è influenzata tanto dalla qualità dell'aria proveniente dall'esterno, quanto dalla presenza di fonti di inquinamento collegate alle attività che si svolgono negli stessi ambienti interni, nonché alla presenza di fonti di emissioni specifiche più o meno continue e puntiformi.

Fonti di emissione di inquinanti negli ambienti confinati includono:

- materiali d'arredo, che possono rilasciare alcune sostanze chimiche assorbite durante i processi di produzione, verniciatura e pulizia; inoltre, in caso di scarse condizioni igieniche possono agire come serbatoi per polvere, microrganismi, insetti e acari;
- materiali da costruzione, che possono favorire la colonizzazione microbica di pareti, soffitti, pavimenti, ma anche la comparsa di umidità e la formazione di cavità ricettive per la contaminazione;
- prodotti utilizzati per la messa in opera e la rifinitura delle mura, delle pavimentazioni e degli impianti che possono emettere sostanze chimiche provenienti da vari tipi di materiali (particolarmente grave la presenza di amianto);
- aerosol emessi da soffioni di docce, rubinetti, fontane, ed, in generale, elementi di arredo o tecnologici che diffondono microparticelle d'acqua;
- vegetazione.

Quando si considera la contaminazione *indoor* ci si concentra soprattutto sulla presenza di inquinanti di natura chimica. Tuttavia, non possono essere trascurati gli effetti sulla salute indotti da particelle biologiche che, sempre presenti nell'aria esterna, come in quella di ambienti confinati, sono comunque inalate.

Il bioaerosol, infatti, può rappresentare una componente importante dell'inquinamento dell'aria *indoor*. Quindi il suo campionamento e analisi, oltre a permettere di valutare le caratteristiche biologiche dell'aria, rappresenta anche uno strumento necessario nella prevenzione del rischio sanitario per la popolazione (13, 14).

Inoltre negli ambienti *indoor* possono essere presenti allergeni provenienti da varie fonti allergeniche, sia tipicamente che occasionalmente *indoor*, che possono contribuire a modificare ulteriormente il quadro, già abbastanza complesso, degli inquinanti potenzialmente presenti in tali ambienti.

2. AMBIENTI *INDOOR*: INQUINAMENTO BIOLOGICO

Caratteristiche del bioaerosol

L'aria rappresenta il veicolo attraverso cui gli agenti microbici (quasi sempre aggregati tra loro o a particelle inerti in sospensione) si muovono nell'ambiente, raggiungono le superfici e vi si depositano. Infatti, l'aria contiene un gran numero di microrganismi e rappresenta il mezzo responsabile della loro trasmissione o dispersione. Un eventuale monitoraggio delle superfici è, d'altra parte, essenziale per conoscere il *fall-out* microbico, cioè quella parte di bioaerosol e di microrganismi in esso presenti che si deposita sulle superfici andando così a costituire un potenziale veicolo di infezione.

Possono essere componenti del bioaerosol frammenti vegetali e cellulari, batteri, funghi, virus, parassiti, spore microbiche, presenti come particolato, e composti organici liquidi o volatili, tra cui sottoprodotti del metabolismo microbico (Fig. 1 – da Bonadonna, Marconi, 1990).

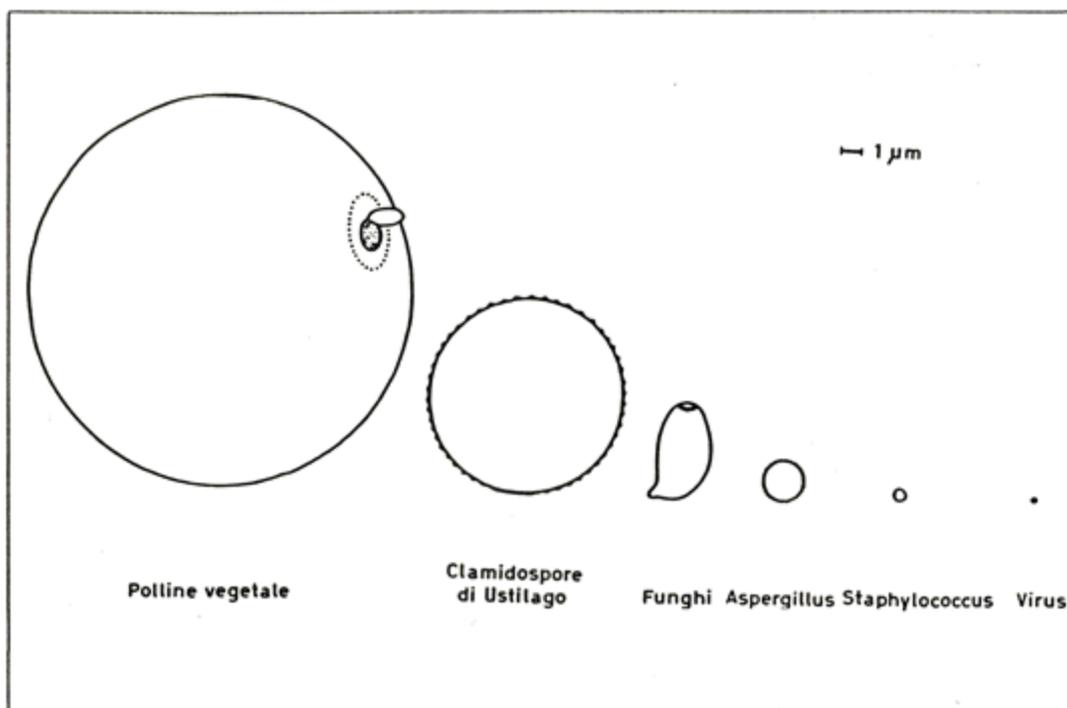


Figura 1. Principali specie di particelle di origine biologica e loro dimensioni.

Il bioaerosol generalmente presenta diametri variabili da 0,3 a 100 μm ; tuttavia la frazione respirabile, composta da particelle con diametri da 1,0 a 10 μm , è di primaria importanza per le reazioni che può causare negli organismi viventi. Le particelle di minore entità non possono trasportare batteri e funghi che, spesso, sono più grandi delle particelle stesse di polvere, ma possono trasportare altri tipi di bioaerosol, quali, ad esempio, endotossine batteriche. Le particelle di dimensioni variabili da 1,0 a 5,0 μm rimangono per più tempo in sospensione in aria, mentre le particelle più grandi tendono a depositarsi più rapidamente sulle superfici a causa della maggiore massa (4).

L'effetto del bioaerosol sulla salute è condizionato non solo dalla capacità di penetrazione nel sistema respiratorio, ma anche dalla composizione e dall'attività biologica delle particelle stesse (5).

Infatti, le sostanze inquinanti negli ambienti confinati sono presenti in genere soltanto in tracce; tuttavia anche un'esposizione prolungata a basse concentrazioni può comportare conseguenze per la salute.

A livello *indoor*, il rischio espositivo ad aria contaminata, diversamente dal rischio professionale od occupazionale strettamente limitato a categorie ben definite, interessa una parte estesa della popolazione che trascorre fino all'80-90% del tempo in ambienti confinati e assume, inoltre, una spiccata rilevanza sanitaria per quanto attiene quelle fasce più sensibili, come bambini, anziani e persone affette da patologie croniche cardiache, respiratorie o allergiche, poiché costretti a trascorrere molta parte della giornata in ambienti chiusi.

I contaminanti possono agire, infatti, sia singolarmente che in sinergia con altri fattori, come parametri stagionali e meteorologici, condizioni strutturali e microclimatiche, numero e tipologia di soggetti presenti e attività svolta nell'ambiente.

Tra i biocontaminanti ambientali, oltre ai virus, ai microrganismi e alle loro forme di resistenza e diffusione (spore, conidi, uova, cisti, oocisti) vengono a essere compresi anche gli allergeni di origine biologica, come i residui metabolici di vari organismi, i pollini vegetali, le proteine delle particelle fecali degli acari e quelle costituenti la forfora o il pelo degli animali domestici, nonché gli agenti contenuti nella saliva e nell'urina di tali animali.

Tutti questi elementi, di facile diffusione, possono contribuire alla formazione di particolato e costituire supporto organico per la sopravvivenza di forme microbiche.

DRAFT

3. RIFERIMENTI NORMATIVI E LINEE GUIDA

Un adeguato monitoraggio, effettuato con metodi idonei e tecniche di campionamento appropriate allo specifico tipo di bioaerosol, è essenziale per ottenere risultati che possano essere facilmente interpretati e confrontati, e che siano attendibili (6).

L'Unione Europea, negli ultimi anni, ha proposto una strategia per l'Ambiente e la Salute, denominata SCALE (*Science, Children, Awareness, legal instrument, Evaluation*), finalizzata alla valutazione delle problematiche associate alle matrici ambientali e connesse agli stili di vita della popolazione e al miglioramento della qualità dell'aria *indoor* soprattutto delle scuole.

In anni recenti, anche in Italia, è emersa l'importanza della valutazione della qualità degli ambienti *indoor* per la salute pubblica. In particolare, il Piano Sanitario 2006-2008, in accordo con il progetto europeo SCALE, ha individuato una serie di procedure di controllo delle patologie correlate all'ambiente, con una particolare attenzione alle fasce più suscettibili, soprattutto quella dei bambini (7).

Tuttavia l'Italia non dispone ancora di una normativa organica e specifica per il controllo della qualità dell'aria negli ambienti confinati, ma a seguito di un accordo tra il Ministero della Salute, le Regioni e le province Autonome sono state emanate linee guida per la tutela e la promozione della salute negli ambienti confinati. Le linee guida forniscono informazioni fondamentali per la valutazione e la gestione, in termini di sanità pubblica, dei rischi per la salute connessi all'inquinamento dell'aria *indoor* ed indicazioni tecniche per orientare le azioni di prevenzione e controllo di tali rischi.

Sul piano legislativo un importante passo avanti è stato fatto con il Decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri del 23 dicembre 2003 che recepisce l'Accordo tra Stato, Regioni e province Autonome di Trento e Bolzano per la tutela della salute dei non fumatori e fissa i requisiti tecnici dei locali per fumatori.

Per garantire condizioni di qualità dell'aria *indoor* è necessario effettuare controlli sistematici in ambienti potenzialmente a rischio basati su procedure definite e idonee che permettano di ottenere risultati attendibili e confrontabili.

In attesa che anche nel nostro Paese si arrivi ad una legislazione che esprima compiutamente modalità specifiche cui attenersi nell'analisi dell'inquinamento biologico negli ambienti *indoor*, per trovare indicazioni in questo senso si può fare riferimento ai principali standard internazionali in materia, come quelli canadesi, quelli dell'EPA e quelli dell'Organizzazione Mondiale della Sanità.

La sola normativa che riporta indicazioni specifiche circa la sicurezza negli ambienti è il D. L.vo 81/2008, che però non fornisce raccomandazioni relative a parametri e limiti di carica batterica o micotica.

Per esprimere un seppur indicativo giudizio sulla qualità microbiologica dell'aria, a tutt'oggi è solo possibile confrontare dati ottenuti dal monitoraggio ambientale con quanto consigliato da standard internazionali o risultati di studi mirati (11).

Per quanto riguarda le procedure di rilevamento la norma UNI EN 13098 che è specifica per gli ambienti di lavoro, ma può essere applicata in qualsiasi tipo di ambiente sia necessario effettuare valutazioni analitiche.

Per quanto riguarda *Legionella*, che pure rientra a pieno titolo nella problematica igienico-sanitaria dell'aria *indoor*, in quanto responsabile di numerosi e gravi episodi di malattia con esiti anche fatali, oggetto di grande attenzione medico-scientifica, si rimanda alle specifiche linee guida già esistenti. Allo stato attuale i principali documenti di riferimento sono "Le linee guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi" predisposte dal Ministero della sanità e adottate dalla Conferenza Stato-Regioni nel 2000 e, del 2005, le "Le linee guida recanti indicazioni sulla legionellosi per i gestori di strutture turistico-ricettive e termali".

Per quanto riguarda la presenza di allergeni negli ambienti *indoor*, sono ad oggi disponibili, inoltre, alcune linee guida indirizzate alla gestione del paziente allergico e asmatico. Alcune di quelle più importanti sono le seguenti:

- Linee guida GINA: The Global Initiative for Asthma (Iniziativa Globale per l'Asma) disponibili sul sito <http://www.ginasthma.org/>;
- Linee guida ARIA: Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (la Rinite Allergica ed il suo Impatto sull'Asma), disponibili sul sito <http://www.progetto-aria.it/>;
- Linee guida NAEPP: National Asthma Education and Prevention Program's Expert Panel Report 3 Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma: full report 2007. Bethesda MD: National Institutes of Health, National Asthma Education and Prevention Program; 2007. Disponibile sul sito: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/asthma/asthgdln.pdf>.

Infine il Ministero della Salute ha istituito un Gruppo di Lavoro denominato "Progetto n.1 Programma di prevenzione per le scuole dei rischi indoor per malattie respiratorie e allergiche"(GARD-I n°1). La GARD-I è un'alleanza nazionale volontaria che coinvolge i principali *stakeholder* delle malattie respiratorie (società scientifiche, associazioni dei pazienti, università ed Enti di ricerca), finalizzata all'elaborazione ed applicazione di una strategia globale ed integrata per ridurre incidenza, morbosità e mortalità delle malattie respiratorie croniche nel lungo periodo. Il gruppo di lavoro ha recentemente redatto il seguente documento: "La qualità dell'aria nelle scuole e rischi per malattie respiratorie e allergiche. Quadro conoscitivo sulla situazione italiana e strategie di prevenzione" (*riferimento in bibliografia*), disponibile sul sito: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1892_allegato.pdf.

4. ALLERGENI NEGLI AMBIENTI INDOOR

Esposizione ad allergeni comunemente definiti *indoor* può verificarsi sia in ambienti aperti al pubblico (scuole, uffici, centri commerciali, cinema, teatri, mezzi di trasporto, ecc.) che nelle abitazioni.

È stato ormai ampiamente dimostrato che le patologie respiratorie allergiche, quali ad esempio l'asma, sono il risultato dell'interazione tra predisposizione genetica dell'individuo ed esposizione ambientale. Inoltre esiste l'evidenza di una relazione dose risposta tra esposizione ambientale ad alcuni allergeni *indoor* e sensibilizzazione (presenza di anticorpi IgE specifici), nonché tra esposizione ambientale e insorgenza della sintomatologia allergica ed asmatica in individui già sensibilizzati (Berrylin J. Ferguson, 2008; Thomas Platts-Mills *et al*, 2007).

Le fonti allergeniche *indoor* più comuni possono essere così raggruppate:

- Acari (*Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae*),
- Mammiferi (derivati epidermici di animali di *Felis domesticus* e *Canis familiaris*),
- Scarafaggi (*Blattella germanica* e *Periplaneta americana*),
- Miceti (*Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Alternaria* spp).
- Allergeni normalmente *outdoor* occasionali nell'ambiente *indoor* (pollini)

Nel 3rd *International Workshop on Indoor Allergen and Asthma* (Platts-Mills *et al*. 1997), per alcuni allergeni, sono stati definiti dei valori soglia di esposizione ambientale per lo sviluppo di una sensibilizzazione allergica e per l'insorgenza dei sintomi nei pazienti già sensibilizzati. Per quanto riguarda gli allergeni maggiori degli acari, Der p 1 e Der f 1, tali valori corrispondono a 2 µg di allergene per grammo di polvere (sensibilizzazione) e 10 µg di allergene per grammo di polvere (insorgenza dei sintomi). Valori simili (sensibilizzazione: 1-2 µg/g e sviluppo dei sintomi: 8-10 µg/g) sono stati proposti successivamente anche per l'allergene del gatto Fel d 1 e del cane Can f 1, altre importanti molecole allergeniche presenti nella polvere (Arbes *et al*. 2004).

L'acquisizione di informazioni sull'esposizione agli allergeni *indoor* è di notevole utilità per almeno due ragioni: in primo luogo permette di valutare i fattori di rischio per la sensibilizzazione e/o l'insorgenza dei sintomi ed in secondo luogo permette di indirizzare correttamente il problema della riduzione dell'esposizione agli allergeni.

In questo contesto un gran numero di studi anche recenti sono stati condotti al fine di valutare il livello degli allergeni *indoor* negli ambienti pubblici e privati, nonché la correlazione della loro concentrazione con l'insorgenza dei sintomi nei pazienti. In particolare, una serie di studi sono stati effettuati anche dall'Istituto Superiore di Sanità nell'ambito di vari progetti scientifici allo scopo di mettere a punto metodiche di campionamento e di analisi standardizzate e di ottenere informazioni sulla presenza

degli allergeni *indoor* in scuole, uffici ed abitazioni. Infatti, l'applicazione di procedure rigorose e standardizzate in tutte le fasi del processo, dalla raccolta del campione fino al dosaggio dei singoli allergeni, costituisce un aspetto di primaria importanza per acquisire informazioni accurate sulla problematica (Brunetto *et al.* 2009).

Ad oggi sono disponibili in commercio una serie di kit ELISA standardizzati che si avvalgono dell'utilizzo di anticorpi monoclonali per il dosaggio di alcuni degli allergeni più diffusi: Der f 1, Der p 1, Mite group 2, Blo t 5 (acari); Fel d 1, Can f 1, Rat n 1, Mus m 1 (mammiferi); Bla g 1, Bla g 2 (blatte); Asp f 1, Alt a 1 (muffe). Inoltre, la concomitante disponibilità di appositi filtri per il campionamento può costituire notevole ausilio al fine della standardizzazione di tutto il processo.

Occorre sottolineare che l'attenzione si è ovviamente focalizzata sugli allergeni maggiori essendo gli allergeni più importanti dal punto di vista clinico, ma per ciascuna specie allergenica esistono anche altre molecole potenzialmente importanti (allergeni minori) le quali, se pur riconosciute da una percentuale minore di sieri di pazienti allergici, possono essere ugualmente importanti per tali soggetti. Pertanto la possibilità di avere a disposizione dei sistemi per dosare anche gli allergeni minori sarebbe importante anche per completare il quadro, soprattutto in quelle situazioni più complesse in cui esistono pazienti allergici ai soli allergeni minori e per i quali la diagnosi e la valutazione della reale esposizione è ancora più complessa.

Ovviamente l'analisi del rapporto tra l'esposizione ambientale agli allergeni e la sensibilizzazione è molto complessa poiché non è facile stabilire ove e quando avviene la sensibilizzazione e quali concentrazioni di allergeni possono indurla, dal momento che un individuo difficilmente permane tutto il giorno in un singolo ambiente *indoor*. È invece più facile valutare se la carica allergenica presente nel luogo in esame può essere causa di insorgenza di sintomi e/o esacerbazione della patologia allergica.

Gli allergeni *indoor* responsabili delle patologie allergiche possono essere definiti "perenni", in quanto presenti tutto l'anno con concentrazioni più o meno variabili, nell'ambiente in questione, e risentono molto poco della fluttuazione che invece caratterizza la periodicità degli allergeni comunemente definiti *outdoor*. Come sottolineato in precedenza, le fonti allergeniche *indoor* più comuni sono rappresentate da Acari, Scarafaggi, Mammiferi e Miceti.

Acari

Nell'ambito degli acari, soprattutto due sono le specie che sono rappresentate nell'ambiente e che sono state maggiormente studiate: il *Dermatophagoides pteronyssinus* e il *Dermatophagoides farinae*. Gli acari, unitamente alle loro spoglie ed escrementi, sono abbondanti in materassi, poltrone, tappeti ed altre suppellettili domestiche, ma sono stati riscontrati anche in ambienti pubblici. Quindi anche in tali ambienti si possono instaurare condizioni favorevoli allo sviluppo e la diffusione di allergeni da acaro, tipici delle abitazioni. Gli allergeni cosiddetti "maggiori" delle specie *D. pteronyssinus* e *D. farinae* sono Der p 1 e Der f 1, glicoproteine presenti essenzialmente nelle feci, e Der p 2 e Der f 2, estratte dal corpo dell'acaro. Per quanto

riguarda i valori soglia di esposizione, vengono considerati i limiti proposti dal 3rd *International Workshop on Indoor Allergens and Asthma* e, cioè, 2 µg/g di Der p 1 o Der f 1 quale valore teorico soglia per la sensibilizzazione allergica, e 10 µg/g per l'insorgenza di attacchi acuti di asma (Platts-Mills *et al.* 1997).

Scarafaggi

Due sono le specie di blatte che sono state più studiate, la *Blattella germanica* e la *Periplaneta americana*. Le blatte sono ritenute responsabili di una elevata percentuale di casi di asma in forma severa soprattutto negli Stati Uniti e nel nord Europa, caratterizzata da elevati livelli di IgE. La diagnosi di tale allergia è altamente influenzata dalla qualità non elevata degli estratti disponibili in commercio, che soffrono soprattutto di problemi di stabilità, al pari di quanto accade per i miceti. Anche per questo motivo, la caratterizzazione degli allergeni delle blatte ha visto un forte impegno da parte di numerosi gruppi, che hanno perseguito l'obiettivo di clonare e ottenere in forma purificata tutti i maggiori allergeni delle due specie di blatte.

Sia in funzione della attività di caratterizzazione dell'estratto utilizzato per la diagnosi che allo scopo di standardizzare le varie preparazioni, numerosi gruppi hanno anche sviluppato anticorpi monoclonali che si sono rivelati utili, tra l'altro, per identificare e quantizzare il livello di contaminazione ambientale dovuto alla presenza degli allergeni anche in apparente assenza dell'insetto.

Le blatte rappresentano una significativa fonte di allergeni soprattutto negli edifici con scarso livello igienico ma, in Italia, il fenomeno della sensibilizzazione è ancora in fase di valutazione.

Mammiferi

Le fonti principali riconosciute al momento responsabili delle patologie allergiche sono associate alle specie: *Felis domesticus*, *Canis familiaris*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*.

Ovviamente, le prime due fonti, il gatto e il cane, sono molto diffuse soprattutto perché legate ad alcune abitudini di vita spesso non facilmente modificabili, come appunto quella di avere un animale da compagnia in ambiente domestico.

In modo particolare il Fel d 1, l'allergene maggiore del gatto, si è rivelato tra i più potenti allergeni *indoor* responsabili di attacchi acuti di asma. Come già riportato, per questi allergeni non esistono valori soglia ben definiti, ma sono stati suggeriti i valori di 1 µg/g di Fel d 1 per la sensibilizzazione allergica e di 8 µg/g per l'insorgenza dei sintomi (Arbes *et al.*, 2004). Il Fel d 1 viene prodotto dalle ghiandole sebacee e dalle cellule epiteliali squamose del gatto, si accumula sui peli, e poiché aderisce facilmente al vestiario, può essere trasportato dall'uomo anche in ambienti in cui il gatto non è presente. Aderisce facilmente anche a tappeti, divani e tappezzeria.

Per quanto riguarda l'allergene maggiore del cane, il Can f 1, anche se sono disponibili meno informazioni, poiché il kit per la misura quantitativa dell'allergene

maggiore è disponibile sul mercato da pochi anni, è valido quanto riportato per il Fel d 1.

Miceti

Nell'ambito dei miceti, una distinzione comunemente adottata è quella che prevede l'esistenza di due gruppi, i miceti atmosferici e i miceti domestici. Tra i primi, di un certo rilievo sono l'*Alternaria* spp e il *Cladosporium* spp, con un andamento prevalentemente stagionale, ubiquitari sul terreno insieme ad altri miceti ambientali. Tra i secondi, che ovviamente possono includere anche *Alternaria* spp e *Cladosporium* spp penetrati in ambienti confinati, di grande rilievo è *Aspergillus* spp e più raramente *Penicillium* spp.

Nell'ambito dei Miceti occorre segnalare che la patologia che essi causano non è sempre di natura allergica IgE–mediata e che, specie in particolari soggetti immunodepressi, può essere rappresentata da infezioni anche gravi nell'apparato respiratorio causate dalla inalazione delle spore del fungo *Aspergillus*. Nel caso invece di vere e proprie forme allergiche IgE-mediate, la patologia che essi causano è spesso di difficile diagnosi da un punto di vista allergologico a causa della qualità non sempre ottimale delle preparazioni predisposte per la diagnosi stessa, effettuata mediante test cutanei (*skin prick test*), disponibili sul mercato.

Allergeni occasionali outdoor (Pollini)

Esistono inoltre anche allergeni *indoor* occasionali, cioè tipicamente *outdoor* (pollini, alcune specie di muffe ecc.), ma capaci di accumularsi in ambienti confinati complicando la valutazione dell'intero fenomeno. Due aspetti associati agli allergeni occasionali *indoor* sono importanti. Il primo aspetto è che l'allergene occasionale *indoor*, ad esempio il polline, caratterizzato da un definito periodo temporale di importanza clinica quando presente all'esterno, potrebbe estendere anche di molto tale fascia temporale quando occasionalmente si trova in ambiente *indoor* appunto perché artificialmente mantenuto in concentrazioni significative per lungo tempo. Il secondo aspetto, conseguenza di questo, è che l'esame anamnestico del paziente potrebbe risultrne influenzato al punto tale da produrre una diagnosi non appropriata del tipo di sensibilizzazione.

Per minimizzare tali aspetti e valutare l'opportunità o meno di un'indagine specifica, sarà necessario tener conto, oltre agli eventuali dati del monitoraggio aerobiologico *outdoor*, della presenza e della qualità del verde nelle vicinanze dell'ambiente *indoor* da monitorare.

5. ORGANISMI NEGLI AMBIENTI *INDOOR*

Le caratteristiche architettoniche, la tipologia e destinazione d'uso degli ambienti, i materiali da costruzione nonché le attività espletate e le pratiche di ventilazione possono consentire di raggiungere e mantenere alti livelli di umidità nell'aria interna di un edificio; la presenza, inoltre, di condizioni controllate anche di temperatura determina un *habitat* estremamente favorevole alla sopravvivenza e alla riproduzione di miceti e batteri sui diversi tipi di substrati disponibili.

I microrganismi possono essere veicolati nell'aria per aerosolizzazione, per lo più inglobati nei droplet-nuclei la cui dimensione ne determina il destino.

Negli ambienti indoor possono essere presenti diversi tipi di microrganismi che possono essere abbastanza facilmente rilevati e, in particolare:

- Microrganismi di origine ambientale, ubiquitari in tutte le matrici, appartenenti a generi batterici quali *Bacillus* o *Micrococcus*, e fungini come *Alternaria* spp o *Aspergillus* spp, la cui presenza a picchi di concentrazione particolarmente elevati, pur non comportando alcun rischio per la salute a basse concentrazioni, potrebbe richiedere un approfondimento di indagine;
- Microrganismi che riescono a proliferare in matrici e su superfici particolari e che essendo, quindi, in grado di raggiungere cariche elevate, possono costituire un pericolo per la salute di soggetti immunodepressi;
- Microrganismi tipicamente legati alla presenza di esseri umani o animali, come quelli ad esempio appartenenti ai generi *Staphylococcus* o *Candida* che, costituenti del microbioma umano, possono costituire, tuttavia, un rischio biologico se rappresentati da specie patogene quali *S. aureus* e *C. albicans*.
- Microrganismi di origine animale o umana a deiezione intestinale, come ad esempio coliformi ed enterococchi che possono essere indicatori di contaminazione fecale; tra questi una particolare attenzione va riservata agli enterobatteri come *Escherichia coli* e *Salmonella* spp, quale patogeno primario.

Batteri

Di seguito vengono descritte le caratteristiche di alcuni microrganismi potenzialmente rilevabili nell'aria *indoor*, nella polvere e sulle superfici di ambienti confinati.

***Aeromonas* spp**

I batteri appartenenti al genere *Aeromonas* sono batteri ambientali rilevabili prevalentemente nelle acque. Sono bastoncelli motili e non motili, non sporigeni, gram-negativi, ossidasi positivi e anaerobi facoltativi. Alcuni genotipi, sono a tutt'oggi considerati potenziali responsabili di patologie, come infezioni gastroenteriche o cutanee a valle di esposizioni a dosi infettanti di questo batterio rilevate sia in soggetti sintomatici che asintomatici. I genotipi presenti nell'ambiente spesso non hanno le

caratteristiche di quelli patogeni, tuttavia alcune fenospecie di *Aeromonas* sono in grado di produrre differenti fattori di virulenza, come tossine extracellulari, citotossine ed enterotossine. Nello specifico, *Aeromonas hydrophila* è stato riconosciuto come potenziale agente di AGI (Acute Gastrointestinal Illness), setticemie, coliti e meningiti. La presenza di *Aeromonas* spp nell'aria è segnalata raramente, mentre su superfici è più comune trovare specie appartenenti al genere.

Attinomiceti

Bacilli Gram-positivi aerobi, per lo più saprofiti, appartenenti all'ordine *Actinomycetales*, morfologicamente simili ai miceti filamentosi per la produzione di un lungo e sottile micelio settato. Largamente diffusi in natura poiché ubiquitari, sono rilevabili in tutte le matrici ambientali e soprattutto nel suolo dove concorrono alla decomposizione della sostanza organica.

Di alcune specie è accertata la patogenicità in relazione a inalazione di *bioaerosol* contaminati. Allergie e risposte infiammatorie possono manifestarsi soprattutto in soggetti immunodepressi in associazione ad esposizione a metaboliti tossici.

Microrganismi estremamente resistenti in grado di sopravvivere ai fattori ambientali ostili e soprattutto ai trattamenti di igienizzazione e potabilizzazione delle acque. Va sottolineato, infatti, che solo nelle acque potabili la concentrazione di attinomiceti varia generalmente da 10 a 10³ UFC/100 ml. I generi maggiormente riscontrati sono *Streptomyces* e *Nocardia* e, sebbene la loro eventuale presenza nelle reti di distribuzione idrica non sembra possa rappresentare un rischio reale per la popolazione sana, essi possono essere diffusi nell'ambiente tramite aerosolizzazione da fontane, docce, rubinetti, ecc. e provocare allergie qualora inalati.

Il genere *Streptomyces* comprende oltre 400 specie aerobie, dotate di lunghi filamenti non frammentabili, abilitate alla decomposizione di sostanze organiche complesse, naturali o di sintesi come, ad esempio, cere, gomma e paraffina.

Diversamente, il genere *Nocardia* è dotato di lunghi filamenti facilmente frammentabili ed è il principale patogeno responsabile di infezioni e crisi respiratorie. *Nocardia asteroides*, *Nocardia brasiliensis* e *Nocardia caviae* sono le principali specie che determinano infezioni nell'uomo, soprattutto quando l'immunocompetenza è fortemente compromessa. La specie ubiquitaria *N. asteroides*, presente in particolare nel terreno e nella vegetazione in decomposizione e quindi veicolabile con le polveri, è responsabile della nocardiosi polmonare, patologia poco comune del sistema respiratorio ma potenzialmente rilevabile a qualsiasi latitudine e in qualunque classe di età, con maggiore incidenza tra gli anziani di sesso maschile. Diversi sono i fattori predisponenti la malattia che è stata anche riconosciuta come infezione opportunistica in soggetti malati di AIDS in fase avanzata. Altre specie di *Nocardia* spp, talora, possono provocare infezioni localizzate o, occasionalmente, sistemiche.

Enterococchi/Streptococchi fecali

Al gruppo enterococchi/streptococchi appartengono cocci Gram-positivi, catalasi negativi, del diametro di circa 1 µm, disposti singolarmente, oppure in coppie o, più

frequentemente, a catena, anaerobi facoltativi e immobili, e con l'eccezione di *Enterococcus casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. sulfureus*, provvisti dell'antigene D.

Il genere comprende specie determinate sulla base delle sequenze della subunità 16S dell'rRNA che hanno permesso di individuare la presenza di specie di gruppo. Gruppi diversi sono stati individuati nel genere *Enterococcus* e comprendono le specie *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundtii* (primo gruppo); *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus* e *E. malodoratus* (secondo gruppo); *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* (terzo gruppo) *E. faecalis*, *E. cecorum*, *E. colombae* e *E. saccharolyticus*, che hanno tra loro una bassa similarità genotipica, sono stati inseriti in un quarto gruppo. L'appartenenza al genere *Enterococcus* di specie diverse anche dal punto di vista molecolare comporta difficoltà nell'individuare test fenotipici capaci di identificare il genere.

Secondo la nuova tassonomia, nel genere *Streptococcus* si individuano gli streptococchi orali, gran parte dei quali opportunisti patogeni e poco adattabili alla sopravvivenza nell'intestino, e gli streptococchi di prevalente derivazione animale con habitat intestinale. Le specie che vengono comprese in quest'ultimo sottogruppo (*S. bovis*, *S. equinus*, *S. alactolyticus*, *S. suis*, *S. intestinalis*, *S. hyointestinalis*) hanno caratteristiche diverse dal punto di vista genotipico e differente significato sanitario. La loro proporzione è diversa nelle feci delle diverse specie animali e comunque sempre prevalente rispetto alla loro concentrazione nelle feci umane.

La presenza di enterococchi nell'aria è segnalata raramente, mentre su superfici è più comune trovare specie appartenenti al genere. In ogni caso, evenienze di questo tipo sono comunque da mettere in relazione a sicura contaminazione di origine fecale.

Escherichia coli

Escherichia coli è un batterio Gram-negativo appartenente alla famiglia delle Enterobacteriaceae; è il più noto rappresentante della flora microbica intestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo. Di norma, tale microrganismo non è patogeno. Tuttavia, nell'ambito della specie, esistono centinaia di sierotipi che si caratterizzano per le diverse combinazioni degli antigeni O, H, K e F e sono stati distinti alcuni ceppi che hanno acquisito patogenicità, dotati di fattori di virulenza e associati a ben determinate patologie sia intestinali che extraintestinali. Un importante sottogruppo degli *Escherichia coli*, è quello costituito dagli *E. coli* enteroemorragici (EHEC) produttori di verotossine.

E.coli da oltre un secolo viene considerato indicatore di contaminazione fecale ed essendo un batterio che si può rilevare anche nelle acque può essere facilmente aerosolizzato, con tempi considerevoli di sopravvivenza, qualora presente, nei droplet-nuclei.

Per molti microrganismi l'evaporazione della gocciolina è immediatamente microbicida, e nel caso dei batteri Gram-negativi implica l'immediato rilascio di endotossina; per *Escherichia coli*, ad esempio, meno del 10% delle cellule sopravvive dopo evaporazione dei droplet-nuclei.

La presenza di *E. coli* nell'aria è segnalata raramente, mentre su superfici di ambienti particolari è più probabile riscontrarne la presenza.

Legionella

Bacillo Gram-negativo, aerobio e asporigeno, mobile per la presenza di uno o più flagelli.

Dei 14 sierogruppi riconosciuti, appartenenti alla specie *Legionella pneumophila*, i sierogruppi dall'1 al 6 sono i maggiormente implicati nella patologia umana. L'infezione da *Legionella* può essere associata ad inalazione di aerosol contaminati e particelle di polvere da essi derivate per essiccamento, ad aspirazione di acqua contaminata e comunque è segnalata in relazione a diffusione di aerosol provenienti da torri di raffreddamento, impianti di climatizzazione e condensatori evaporativi, nonché a impianti di distribuzione di acqua potabile (soffioni delle docce, rubinetti), apparecchiature sanitarie, deumidificatori e fontane. Condizioni di rischio sono anche quelle associate ad aerosol di stabilimenti termali e di vasche per idromassaggio.

Il batterio è considerato il maggior responsabile di patologie a trasmissione idrica. La legionellosi, forma severa di polmonite, e la febbre di Pontiac, forma simil-influenzale ma debilitante, sono le infezioni associate al genere.

La legionellosi può manifestarsi con fenomeni epidemici variabili che vanno da un *cluster* di esposizione nel tempo e nello spazio, ad una serie di casi indipendenti in aree ad alta endemia, a casi sporadici senza un evidente raggruppamento temporale o geografico. Focolai epidemici si verificano ripetutamente in ambienti collettivi a residenza temporanea, come ospedali ed alberghi.

L'abbattimento delle concentrazioni di *Legionella* nelle acque e negli impianti idrici non è attuabile in quanto il batterio fa parte della flora naturale delle acque, sopravvive nel biofilm e all'interno di amebe.

Micobatteri

La recente sistematica colloca il genere *Mycobacterium* all'interno della famiglia delle *Mycobacteriaceae* facente parte della classe delle *Actinobacteridae*. Per potere valutare il loro ruolo patogeno c'è la tendenza a raggruppare le specie in *cluster* noti come complessi (complex). In questo caso, i complessi più conosciuti sono il *Mycobacterium tuberculosis* complex ed il *Mycobacterium avium* complex.

M. tuberculosis (bacillo di Koch) è responsabile della tubercolosi nell'uomo. La tubercolosi (TBC) primaria nell'immunocompetente è per lo più asintomatica o paucisintomatica, mentre la TBC primaria in persone a rischio ha una localizzazione polmonare progressiva primaria. In questo caso, la diagnosi si avvale dell'esame microscopico, colturale, di esami biochimici e immunomolecolari.

È proprio nelle goccioline aerodisperse che sopravvive oltre il 90% delle cellule di *M. tuberculosis*. Diversamente dal *M. tuberculosis*, i Micobatteri ambientali non-tubercolari sono considerati batteri patogeni opportunisti, naturali abitanti di un'ampia varietà di serbatoi ambientali e non, incluse le acque naturali e trattate, il suolo, la polvere, gli alimenti, la vegetazione e il bioaerosol generato da sorgenti infette, umane o ambientali. Inoltre, vengono eliminati da vari animali in cui sono agenti eziologici di malattie. Per questi batteri la distinzione tassonomica ha la sua

importanza perché le varie specie micobatteriche differiscono per virulenza e, in molti casi, per la sensibilità ai farmaci.

In aria, sulle superfici e nella polvere sono spesso presenti, ma il loro isolamento e identificazione sono complessi e richiedono lunghi tempi di risposta alle analisi.

Pseudomonas aeruginosa

Bacillo Gram-negativo ubiquitario ambientale, caratterizzato da un'elevata capacità di adattamento per le modeste richieste nutrizionali, rilevabile in tutti gli ambienti umidi e nell'acqua. Si moltiplica facilmente raggiungendo concentrazioni elevate e, sopravvivendo anche in condizioni estreme nell'aria fornisce informazioni sulla presenza di batteri Gram-negativi vitali più difficilmente coltivabili.

Caratteristica peculiare di *P. aeruginosa* è la multiresistenza agli antibiotici che rende questo batterio un fattore non trascurabile di rischio per la salute soprattutto in ambienti ospedalieri dove esso può essere responsabile di infezioni delle vie urinarie, di ustioni e di ferite. Ulcere corneali possono essere, inoltre, causate così come cheratiti, congiuntiviti, otiti, setticemie, ascessi, broncopolmoniti, meningiti e gastroenteriti nei neonati. Quale patogeno opportunisto, è anche noto poiché implicato in infezioni polmonari croniche nei pazienti affetti da fibrosi cistica tra i quali è la causa maggiore di morbilità e mortalità.

La presenza di *Pseudomonas aeruginosa* nell'aria è stata spesso segnalata così come la sua più comune rilevabilità su superfici.

Salmonella spp

Le salmonelle sono bacilli Gram-negativi, asporigeni, anaerobi facoltativi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, ubiquitari, di origine enterica. Il genere, distinto in due sole specie, *S. enterica* e *S. bongori*, comprende sierotipi caratterizzati in base alla diversa composizione di antigeni somatici e flagellari e, in alcuni casi, è anche funzione di specifici caratteri biochimici. Della specie *enterica*, suddivisa in sei sottospecie, si conoscono più di 2400 sierotipi.

La gravità delle patologie è in relazione al sierotipo infettante, al numero di microrganismi e a fattori di resistenza del soggetto.

L'ambiente è un serbatoio di *Salmonella*, soprattutto ambienti idrici contaminati, e molti fattori giocano un ruolo non trascurabile per la sopravvivenza e la diffusione del microrganismo che, in condizioni ambientali favorevoli, può sopravvivere per settimane. La sua diffusione ambientale è sempre conseguente a contaminazione di origine fecale e serbatoi d'infezione sono rappresentati da animali quali, ad esempio, uccelli, suini e animali da compagnia.

La presenza di *Salmonella spp* nell'aria è segnalata raramente, mentre su superfici particolari è più probabile trovare specie appartenenti al genere.

Staphylococcus spp

Gli stafilococchi sono cocci Gram-positivi, largamente diffusi in natura. Si ritrovano nella polvere dei pavimenti, sui muri e su una grande varietà di manufatti. Nell'aria indoor sono facilmente rilevabili e correlabili alla presenza dell'uomo e di animali. Potendo sopravvivere a svariate condizioni ambientali avverse ed essendo

relativamente resistenti al calore, all'essiccamento, ai disinfettanti e ad elevate concentrazioni di cloruro di sodio sono i più resistenti tra i batteri non sporigeni.

Le specie appartenenti al genere *Staphylococcus* sono ubiquitarie nel corpo umano e negli animali. Alcune specie sono saprofiti, altre commensali, ed altre ancora opportuniste patogene. Possono produrre diverse tossine, esoenzimi, enzimi lipolitici e coagulasi. Solo *S. aureus* è realmente considerato patogeno.

In particolare *Staphylococcus aureus*, può intervenire in patologia umana soprattutto come agente eziologico di numerose infezioni della cute e delle mucose. Patologie specifiche sono associate soprattutto o esclusivamente a stafilococchi coagulasi-positivi; altre patologie sono prodotte da stafilococchi coagulasi-negativi ed interessano la cute e gli annessi cutanei (follicoliti, foruncoli, favi, pustole, bolle, vescicole, ascessi, piodermi, impetigini, idrosadeniti, mastiti). In alcuni casi, sono state osservate setticemie gravi con il coinvolgimento di vari organi (fegato, pancreas, milza, tiroide, parotidi), di infezioni respiratorie (polmoniti e pleuro-polmoniti), del sistema nervoso centrale (meningiti e ascessi cerebrali), urinarie (cistiti, cistopieliti, pielonefriti, ascessi renali), dell'apparato scheletrico (osteomieliti e periostiti).

Alcuni biotipi appartenenti alla specie *S. aureus* sono anche responsabili di gravi tossinfezioni alimentari per la capacità di produrre enterotossine termoresistenti e attive per ingestione.

Protozoi

Amebe a vita libera

Le amebe a vita libera hanno diffusione cosmopolita e sono presenti in tutte le matrici ambientali. In particolare, sebbene sia *Acanthamoeba* spp il protozoo più frequentemente riscontrato nell'ambiente, amebe ambientali sono state isolate da suoli, sedimenti, polveri, aria e in tutti i tipi di acque naturali e di ambienti artificiali.

La loro distribuzione e biodiversità è fortemente influenzata da temperatura, umidità, pH, salinità, disponibilità di nutrienti ed è stato riscontrato un andamento stagionale della loro abbondanza nell'ambiente. In *habitat* a condizioni ostili, le amebe producono cisti che esistono solo in condizioni favorevoli liberando trofozoiti. Sopravvivenza e moltiplicazione sono anche condizionate dalla presenza e dalla densità della flora microbica associata.

Delle numerose specie di amebe a vita libera, diverse sono state segnalate in ambienti particolari: da lenti a contatto, a torri di raffreddamento, impianti di climatizzazione, deumidificatori, unità di dialisi, unità dentistiche, apparecchi per il trattamento domestico dell'acqua, e naturalmente impianti idrici e ad uso ricreativo.

Le patologie correlate alla presenza di amebe anfizoiche sono principalmente associate ai generi *Naegleria*, *Acanthamoeba* e *Balamuthia*, mentre *Sappinia diploidea*, agente eziologico di encefaliti, sembra essere meno virulenta. Non è nota la dose infettante, tuttavia è ipotizzabile che sia bassa. Individuate nell'uomo e in animali a sangue caldo e freddo, in soggetti malati sono state isolate da ferite, dalla cornea, dai

polmoni e dal sistema nervoso centrale; la loro presenza è stata rilevata, inoltre, anche in individui sani.

Le amebe assumono un particolare significato sanitario in quanto presenti tra gli organismi colonizzatori dei biofilm, rappresentando, infatti, un elemento favorevole per l'instaurarsi di condizioni idonee alla sopravvivenza e alla moltiplicazione della flora batterica ivi presente. Inoltre è ormai riconosciuta l'importanza delle amebe come vettori primari e potenziali di *Legionella*, Micobatteri e di altri gruppi microbici.

Amebe possono essere presenti nel bioaerosol, sulle superfici e nella polvere negli ambienti *indoor*.

Alghe e cianobatteri

Le alghe fitoplanctoniche sono organismi vegetali fotoautotrofi comprendenti specie unicellulari, pluricellulari e coloniali. Possiedono i plastidi che contengono clorofilla ed altri pigmenti fotosintetici, di fondamentale importanza per lo studio tassonomico. Particolare rilievo assume la determinazione numerica e tassonomica delle alghe appartenenti a specie potenzialmente tossiche e a specie capaci di produrre sostanze odorogene, nonché la sorveglianza sulla periodicità dei fenomeni di fioritura (*blooms*). Infatti, in adeguate condizioni ambientali, le alghe possono produrre spessi strati di cellule nei corpi idrici superficiali e concorrere a una maggiore aereodispersione.

Analogamente alle alghe, i cianobatteri, batteri fotosintetici Gram-negativi, possiedono clorofilla-a e alcuni pigmenti, liberando ossigeno durante la fotosintesi. Caratterizzati da un'elevata variabilità morfologica e dimensionale manifestano proprietà fototrofe aerobie o caratteristiche di crescita eterotrofa. Un'ampia varietà di specie è in grado di produrre tossine e, nel mondo, circa il 60% delle indagini svolte su campioni idrici contenenti cianobatteri ha dimostrato la presenza di tossine. Sono spesso presenti nella polvere, nell'aria e sulle superfici ma il loro isolamento e identificazione risulta articolato con lunghi tempi di risposta alle analisi.

Le alghe sono state segnalate in acque di fontane all'interno di edifici adibiti a esercizi di vendita.

Funghi

I funghi, o miceti, sono organismi eucarioti, chemiosintetici ed eterotrofi, unicellulari o più spesso organizzati in strutture pluricellulari, che possono raggiungere dimensioni notevoli, da 20 a 50 volte superiori a quelle delle cellule batteriche. Possiedono una parete cellulare rigida composta da chitina e si riproducono sessualmente con formazione di spore e, a sessualmente mediante tallospore e conidiospore.

La loro classificazione è basata soprattutto sul particolare ciclo vitale, sulla morfologia delle strutture riproduttive e sul tipo di spore prodotte. Si distinguono,

pertanto, miceti filamentosi, pluricellulari, il cui sviluppo avviene per mezzo di ife con produzione di micelio; funghi dimorfi, che possono acquisire l'aspetto filamentoso o lieviforme in base a specifiche caratteristiche ambientali, e lieviti, unicellulari, che si riproducono per gemmazione. In quest'ultimo caso, in alcune specie i blastoconidi si staccano dalla cellula madre, mentre in altre rimangono attaccati gli uni agli altri a formare lo pseudomicelio.

I funghi sono largamente diffusi in natura, ubiquitari in tutte le matrici ambientali. Nell'aria e nella polvere, come anche su superfici, sono facilmente rilevabili a concentrazioni variabili. I generi *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Absidia*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, che comprendono specie anche potenzialmente patogene, sono quelli più frequentemente riscontrati negli ambienti indoor.

Il metabolismo eterotrofo costringe i funghi a vivere in dipendenza da un ospite; a seconda del tipo di rapporto con l'ospite vengono suddivisi in saprofiti, parassiti e simbiotici. In particolare, i saprofiti sono responsabili della degradazione della sostanza organica e possono vivere negli strati superficiali del suolo e negli ambienti acquatici naturali o artificiali, come ad esempio piscine e acque ricreative, contenenti anche alte concentrazioni di cloro.

Diversi generi, per trasmissione aerea, possono dar luogo a specifiche patologie allergiche, più frequentemente associate a reazioni di ipersensibilità (riniti allergiche, asma bronchiale, alveoliti allergiche).

Le cellule fungine sintetizzano tossine come metaboliti secondari e pertanto possono produrre effetti dannosi per la salute in relazione a specifiche condizioni di esposizione in ambienti confinati e in soggetti con particolare predisposizione dovuta anche a deficit immunitario. Alcune specie producono micotossine; quelle a struttura aromatica e fenolica, ad esempio le aflatossine, lo zearalenone e la griseofulvina, sono in grado di provocare seri effetti sulla salute in seguito ad ingestione, inalazione o contatto.

Le operazioni di quantificazione e di isolamento dei generi fungini non comportano particolari difficoltà, mentre a livello colturale, l'identificazione morfologica e strutturale a livello di specie risulta complessa comportando lunghi tempi di risposta specifica alle analisi.

6. VIRUS NEGLI AMBIENTI *INDOOR*

I virus sono tra le cause più comuni di malattie infettive trasmesse in ambienti confinati, per le loro caratteristiche di elevata contagiosità e resistenza ambientale.

Gli adenovirus sono stati i primi virus ad essere identificati nell'aria di ambienti confinati: nel 1966 adenovirus (sierotipo 4) sono stati identificati in una camerata in cui erano presenti reclute militari con sintomatologia respiratoria (3); successivamente enterovirus (coxsackievirus A-21) sono stati identificati nell'aria di una stanza occupata da volontari con infezione respiratoria acuta (4). Negli anni '80 sono state pubblicate le prime rassegne sui virus in ambienti *indoor* (4, 5). Da allora virus appartenenti a diverse famiglie sono stati identificati nell'aria e sulle superfici di diversi tipi di ambienti confinati. Inoltre diverse epidemie sono state documentate in edifici pubblici e privati, strutture comunitarie (ospedali, scuole, caserme, alberghi), luoghi destinati ad attività ricreative (ristoranti, cinema, teatri) e mezzi di trasporto.

Di seguito verranno descritte le caratteristiche generali di alcuni virus che possono essere trasmessi in ambienti confinati per via aerea (mediante droplet-nuclei) o per contatto indiretto (con goccioline aeree di grandi dimensioni o per contatto con superfici contaminate).

Il **Virus dell'influenza** appartiene alla famiglia *Orthomyxoviridae* ed è responsabile di una malattia acuta del tratto respiratorio altamente contagiosa, caratterizzata da febbre, cefalea, mialgia e tosse. Manifestazioni a carico del tratto gastrointestinale (nausea, vomito, diarrea) possono accompagnare la fase respiratoria. La trasmissione avviene principalmente per diffusione di goccioline di secrezioni naso-faringee liberate mediante tosse e starnuti dalla sorgente di infezione, che possono depositarsi direttamente sulle mucose di ospiti a contatto ravvicinato e/o su oggetti e superfici. Recentemente la trasmissione aerea mediata da droplet-nuclei o polveri contaminate è stata riconosciuta come una importante via di trasmissione per i virus influenzali (6). Infatti virus dell'influenza in particelle di diametro aerodinamico inferiore a 5 μm (frazione respirabile) sono stati identificati nell'aerosol (e sulle superfici) di strutture ospedaliere (7); inoltre concentrazioni più elevate sono state rilevate negli ambienti con più elevato numero di pazienti con sintomi influenzali (7). Virus dell'influenza sono stati inoltre identificati direttamente nelle emissioni di pazienti durante la respirazione, la fonazione e la tosse volontaria (8). La trasmissione aerea del virus in contesto ospedaliero ha una grande rilevanza sanitaria per il numero di soggetti che possono essere coinvolti, oltre che per le possibili complicanze che possono insorgere in pazienti già affetti da altre patologie. In letteratura sono descritte epidemie influenzali in ospedali, case di cura, strutture residenziali, mezzi di trasporto, scuole (9-11). Le scuole, in particolare, rappresentano ambienti ad elevato rischio in quanto i bambini e gli adolescenti presentano elevati *attack-rate*, contribuendo notevolmente alla trasmissione dell'infezione nella comunità. In alcuni paesi la chiusura temporanea delle scuole durante la stagione influenzale ha contribuito a ridurre l'impatto delle epidemie

(11). Gli edifici pubblici possono rappresentare ambienti indoor a rischio; in uno studio recente sono stati identificati virus dell'influenza nei sistemi di ventilazione (filtri campionati a lungo termine) di edifici pubblici, a dimostrazione della presenza dei virus nell'ambiente circostante (12).

I **Rhinovirus** sono piccoli virus appartenenti alla famiglia *Picornaviridae*. Rappresentano la più comune causa di infezione del tratto respiratorio superiore (comuni raffreddori) soprattutto nei bambini, nei quali possono verificarsi 6-8 episodi l'anno. Possono inoltre essere implicati nella acutizzazione di patologie come l'asma e la broncopneumopatia cronica ostruttiva. I rhinovirus sono virus molto infettivi; si stima che un paziente infetto possa causare il contagio del 75% dei membri di una famiglia. Si conoscono più di 100 tipi di rhinovirus con proprietà antigeniche diverse; la grande varietà di antigeni virali determina la frequente ricorrenza dell'infezione. La trasmissione mediata da goccioline di grande diametro è la più diffusa; tuttavia è dimostrata anche la trasmissione attraverso piccole particelle aerosolizzate, sia in condizioni naturali che sperimentali (13). Rhinovirus sono stati identificati nelle emissioni di tosse e starnuti e in campioni di aerosol raccolti in ambienti indoor, in presenza di pazienti sintomatici (14). Sono inoltre stati identificati in veicoli di trasporto e uffici pubblici (13;15). In letteratura sono documentate epidemie in strutture sanitarie e residenziali (16;17), come pure casi di trasmissione intrafamiliare (18).

Gli **Enterovirus** appartengono alla famiglia *Picornaviridae* e sono responsabili di una vasta gamma di patologie a carico di diversi organi e apparati: patologie del sistema nervoso centrale (poliomielite, encefaliti, meningiti asettiche), patologie respiratorie (faringiti, tonsilliti, bronchioliti, polmoniti), patologie gastro-intestinali (diarrea), patologie oculari (congiuntiviti emorragiche), e patologie cardiovascolari (miocarditi). Infezioni da enterovirus sono comuni in tutto il mondo e avvengono tutto l'anno con un picco in estate-autunno nei paesi temperati. In molti casi l'infezione è asintomatica o causa lievi sintomatologie. Gli enterovirus si replicano nel tratto gastro-intestinale e sono trasmessi prevalentemente per via fecale-orale, ma anche attraverso le secrezioni respiratorie. La possibilità di trasmissione aerea è stata dimostrata in uno studio su volontari esposti a coxsackievirus A-21 in un ambiente confinato; il virus è stato rilevato nelle emissioni (tosse e starnuti), oltre che nell'aria della stanza (32). Inoltre, volontari suscettibili esposti nella stessa stanza a distanza dai volontari infetti hanno sviluppato l'infezione in pochi giorni (32). Si ritiene che la trasmissione aerea in ambiente familiare possa aver avuto un ruolo importante nella epidemia da enterovirus 71 che ha coinvolto oltre 300.000 casi (78 morti per edema polmonare) a Taiwan nel 1998, e in epidemie successive (33). Enterovirus sono stati identificati in campioni di aerosol di un ospedale (reparto pediatrico e pronto soccorso) in concentrazioni superiori a quelle di altri virus (adenovirus e virus dell'influenza) (23). Sono inoltre documentate epidemie in reparti ospedalieri di neonatologia e in asili nido (34;35).

I **Coronavirus** sono virus appartenenti alla famiglia *Coronaviridae*, responsabili di infezioni respiratorie lievi in persone di tutte le età. Sono responsabili del 10-20% dei casi di raffreddore comune, che si manifesta soprattutto dalla fine dell'autunno all'inizio della primavera. Possono tuttavia causare, occasionalmente, gravi sindromi delle basse vie respiratorie. Al gruppo dei Coronavirus appartiene il virus della Sindrome Acuta Respiratoria Severa (SARS) responsabile di una forma atipica di polmonite. I pazienti affetti da SARS possono sviluppare gravi disfunzioni respiratorie e polmonite nell'arco di pochi giorni. La maggior parte delle infezioni si verifica attraverso contatti stretti (distanza < 1 metro) tra pazienti e familiari, conviventi e operatori sanitari, a supporto di una ipotesi di trasmissione mediata da contatto diretto o attraverso goccioline di grandi dimensioni. La trasmissione per via aerea è stata ipotizzata per alcune epidemie: la trasmissione all'interno di un aereo dal passeggero sintomatico a viaggiatori localizzati a notevole distanza (19), la trasmissione in un hotel da un ospite a numerosi clienti che soggiornavano sullo stesso piano (20), l'epidemia in un grande complesso residenziale a Hong Kong in cui si sono verificati più di 300 casi di SARS in poche settimane (21). Infine, clusters di SARS si sono verificati tra operatori sanitari esposti durante manovre ad alto rischio di aerosolizzazione, quali intubazione endotracheale e broncoscopia. Il virus è stato identificato in campioni di aerosol prelevati da una stanza occupata da un paziente con SARS (oltre che in diversi oggetti e superfici) (22), a conferma della possibilità di trasmissione aerea. Il controllo della malattia in ambiente ospedaliero, basato sull'identificazione rapida dei casi sospetti e sulla loro gestione appropriata, compreso l'isolamento e l'osservazione dei contatti è fondamentale per ridurre il rischio di trasmissione dell'infezione.

Gli **Adenovirus** appartengono al genere Mastadenovirus, famiglia *Adenoviridae* e sono classificati in 7 specie (A-G) e 51 sierotipi. Le manifestazioni cliniche delle infezioni da adenovirus includono infezioni a carico dell'apparato respiratorio (raffreddore, faringite, laringite, tonsillite, bronchite e polmonite), infezioni a carico dell'apparato gastro-intestinale (gastroenteriti e diarrea), infezioni a carico dell'occhio (congiuntivite follicolare, cherato-congiuntivite epidemica, febbre acuta faringo-congiuntivale), infezioni a carico dell'apparato genito-urinario (cistiti emorragiche). Raramente possono essere colpiti anche altri organi tra cui fegato, cuore e sistema nervoso. Gli adenovirus rappresentano una causa importante di morbilità e mortalità nei pazienti immunodepressi, bambini, neonati e trapiantati. Sono virus altamente contagiosi: espettorato e secrezioni orali possono contenere 10^6 - 10^7 particelle/ml. All'età di dieci anni la maggior parte della popolazione ha contratto almeno un'infezione da adenovirus. Dopo l'infezione si sviluppano di norma anticorpi tipo-specifici che conferiscono una protezione duratura verso l'infezione da parte dello stesso sierotipo. Gli adenovirus sono trasmessi per contatto diretto e per via fecale-orale; occasionalmente possono essere trasmessi per via aerea. Uno studio ha dimostrato che l'esposizione di adenovirus diffusi per aerosol in basse dosi è in grado di provocare infezione in volontari (malattia acuta respiratoria); inoltre studi recenti

hanno documentato la presenza di adenovirus nell'aerosol di reparti in ospedali pediatrici (23).

Negli anni '50 sono state descritte per la prima volta epidemie di malattia acuta respiratoria e polmonite virale da adenovirus fra le reclute militari, caratterizzate da elevata percentuale di ospedalizzazione (24). Da allora sono documentate epidemie in diverse tipologie di ambienti confinati, incluse strutture sanitarie, assistenziali e scuole (25-27). Tuttavia gli studi sulla presenza degli adenovirus nell'aerosol (e sulle superfici) di ambienti indoor sono scarsi.

Il **virus respiratorio sinciziale**, appartenente alla famiglia *Paramixoviridae*, provoca negli adulti sani una sintomatologia simile al raffreddore. Tuttavia la morbilità e la mortalità sono elevate nei neonati, nei pazienti debilitati o con malattie cardiopolmonari croniche o con disfunzioni immunitarie. La trasmissione ha luogo in caso di contatti stretti con pazienti infetti e avviene principalmente attraverso le mucose dell'occhio, del naso o della bocca che vengono in contatto con le secrezioni. In ambito pediatrico il virus è responsabile del 75% dei casi di bronchiolite e di circa il 20% dei casi di ricovero ospedaliero. Infezioni nosocomiali sono osservate frequentemente, trasmesse dai pazienti, nel personale medico e nei visitatori. Le infezioni ospedaliere costituiscono un problema importante nelle unità che ospitano neonati e pazienti trapiantati. In queste strutture gli *attack rate* possono raggiungere il 100% (28). Sono documentate epidemie in case di cura e strutture di assistenza per anziani (29;30). Inoltre il virus è stato identificato nell'aerosol di stanze di degenza in ospedali e in altre strutture sanitarie (7;31) in particelle di piccole dimensioni, a supporto della possibilità di trasmissione per via aerea.

La trasmissione aerea in ambienti *indoor* non è esclusiva dei virus respiratori, ma è una modalità possibile anche per virus con tropismo diverso dall'apparato respiratorio, inclusi virus gastroenterici, come per esempio i norovirus.

I **norovirus** sono virus appartenenti alla famiglia *Caliciviridae*, classificati in 5 diversi genogruppi (GI-GV) di cui GI, GII, e GIV possono causare infezioni nell'uomo. Sono agenti responsabili di gastroenterite sporadica ed epidemica in tutte le fasce d'età e rappresentano un importante problema di sanità pubblica in tutto il mondo. Un soggetto infetto può eliminare nell'ambiente una elevata carica virale (fino a diversi milioni di particelle virali per grammo di feci o per ml di vomito); poiché la dose infettante è molto bassa (10-100 particelle virali) i norovirus sono altamente contagiosi. Questo spiega il frequente verificarsi di epidemie di gastroenterite all'interno di comunità (scuole, case di cura, navi da crociera, ecc). I norovirus sono trasmessi prevalentemente mediante contatto diretto o attraverso acqua e alimenti contaminati. Nonostante non siano considerati patogeni "*airborne*", alcuni studi dimostrano la possibilità di trasmissione per via aerea in ambienti confinati. Le particelle virali possono infatti aerosolizzare durante episodi di vomito o a seguito degli scarichi degli impianti igienici. Tali particelle possono essere inalate, depositate nelle alte vie respiratorie, e successivamente ingoiate con il muco respiratorio. Inoltre possono depositarsi su superfici ed essere trasferite per contatto o essere di nuovo

risospese nell'aria. Una recente rassegna di Nazaroff pubblicata su "Indoor Air" conferma l'importanza della trasmissione aerea per i norovirus in ambienti comunitari, quali ospedali, scuole, asili nido, ristoranti, strutture assistenziali, hotel, sale per concerti e mezzi di trasporto (aerei, autobus, navi da crociera) (36). Nonostante le evidenze scientifiche sulle possibilità di trasmissione aerea, non sono disponibili studi in cui il patogeno è stato identificato nell'aerosol di ambienti indoor. Sono invece disponibili studi sulla presenza dei norovirus su superfici e oggetti (37).

La mancanza di valori soglia per i virus in ambienti indoor, e la mancanza di specifici riferimenti normativi, rendono di difficile interpretazione gli studi e le ricerche su questo argomento. In generale le dinamiche della sopravvivenza e della disseminazione/trasporto dei virus in ambienti indoor, come pure il ruolo della ventilazione e di altri fattori ambientali, sono ancora poco conosciuti. Di conseguenza risulta limitata anche la possibilità di prevenire e controllare le infezioni virali in questi ambienti.

DRAFT

7. TOSSINE NEGLI AMBIENTI *INDOOR*

Negli ambienti confinati si ritrova una grandissima varietà di contaminanti biologici dell'aria e svariati sono i microrganismi vitali e non vitali che un bioaerosol *indoor* può contenere, incluse le componenti biologiche attive da essi derivate.

A causa della loro natura ubiquitaria, diverse tossine possono essere rilevate in vari ambienti con differenti destinazione d'uso. Solitamente, non essendo volatili, esse si muovono con il particolato aerodisperso cui sono adese, particelle di polvere, cellule batteriche in aggregati di piccole dimensioni o con gli aerosol acquosi, in associazione con le goccioline di acqua nebulizzate dagli umidificatori o emesse dagli impianti di climatizzazione, e presentano una vasta distribuzione in termini di misura e dimensione.

Dai microrganismi presenti nell'aria sono prodotti anche enzimi idrolitici, di tipo costitutivo e di tipo inducibile (amilasi, cheratinasi, collagenasi, condroitinsolfatasi, elastasi, fosfatasi, fosfolipasi, gelatinasi, ialuronidasi, lecitinasi, lipasi, pectinasi, proteinasi, ureasi). Essi esplicano un ruolo fisiologico nella morfogenesi, ma mediano anche l'invasività danneggiando le membrane cellulari dell'ospite.

Endotossine batteriche

L'esistenza di endotossine batteriche in ambienti confinati è ascrivibile alla presenza di batteri Gram-negativi, siano essi patogeni che non, in quanto esse sono componenti strutturali della loro complessa parete cellulare che, dotata di potere tossigeno, provoca diverse reazioni biologiche negli esseri umani (Dragagna R., 2004).

Nello specifico, con il termine "endotossine" si intendono i lipopolisaccaridi (LPS) che, come parte integrante della cellula batterica gram-negativa, costituiscono lo strato esterno della parete cellulare e partecipano a molte funzioni essenziali, dalla crescita alla sopravvivenza batterica; vengono rilasciate in piccole quantità in forma solubile durante lo sviluppo vegetativo e in grande quantità soltanto quando la cellula batterica si disgrega per autolisi, per lisi esterna o per digestione fagocitaria.

I LPS sono macromolecole anfipatiche altamente complesse e di elevato peso molecolare, che differiscono per struttura sia nei batteri dello stesso ceppo che in quelli di ceppi diversi. Contengono un lipide e una porzione polisaccaridica, perciò sono dotati di un polo idrofobo e di un polo idrofilo. Questa tipologia di macromolecole è stata rilevata nella maggior parte dei gruppi tassonomici dei batteri Gram-negativi quali, ad esempio, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* e *Rhodospirillaceae* mentre non è stata rilevata nella parete cellulare dei batteri Gram-positivi, dei micobatteri o dei funghi che ne risultano privi.

Tali molecole sono costituite, in sintesi, da una regione lipidica interna denominata lipide A, che mostra piccole variazioni nei diversi generi batterici ed è responsabile della tossicità molecolare e svolge un'accertata funzione immunogenica, e da una

lunga catena polisaccaridica che esibisce variazioni conformazionali e facilita le interazioni molecolari con i recettori cellulari. La porzione polisaccaridica, a sua volta, è composta da due frazioni: il polisaccaride interno (core-polisaccaride o antigene R) e il polisaccaride esterno (antigene somatico O).

I livelli di endotossina che si possono riscontrare nell'*indoor*, sono in relazione con l'incidenza dei batteri Gram-negativi, la cui sopravvivenza è a loro volta principalmente influenzata da condizioni ambientali quali disponibilità del substrato di adesione, di eventuali sostanze nutritive e grado di temperatura e di umidità. L'esposizione ad endotossine sembra essere pertanto associata alla presenza di polvere organica eterogenea, costituita da macro- e micro-molecole derivanti dalla frammentazione di materiale vegetale e/o animale, enzimi, muffe e spore, micotossine, batteri termofili e mesofili e loro componenti biochimici tra cui, appunto, le endotossine.

Elementi d'arredo, quali moquette, tappeti, tendaggi e quant'altro di natura tessile, possono detenere, concentrare e contribuire a generare tale polvere organica comprensiva di endotossine. Uno studio belga su diverse tipologie di uffici ubicati in strutture edili salubri, molti dei quali provvisti di tappeti o di pavimenti sintetici, e condotto con monitoraggi effettuati sul bioaerosol, sulle superfici dei piani di lavoro e sulla polvere prelevata dai tappeti di 25 uffici, ha riscontrato livelli di concentrazione batterica che variavano, nel bioaerosol, da 44 a 2.511 UFC/m³ e, sulle superfici, da 1 a 1.000 UFC/cm². Sui tappeti il titolo batterico risultante nella polvere prelevata era compreso nell'intervallo 0,73-185x10⁵ UFC/g. La concentrazione di endotossina analizzata esclusivamente associata alla polvere, variava da 4,6 a 116,2 UE/mg (Bouillard et al., 2005).

Secondo una ricerca (Thorn et al., 2005), tra gli ambienti *indoor*, la camera da letto è uno dei luoghi in cui vi è la maggiore concentrazione di batteri, le cui endotossine, scatenando la produzione di citochine una volta respirate, sono responsabili di crisi asmatiche e affanni respiratori. Tale studio ha dimostrato che non è soltanto la concentrazione delle endotossine ad essere pericolosa, ma anche la durata dell'esposizione così come la velocità di respirazione (William et al., 2007). Il luogo dove è stata riscontrata la maggiore concentrazione di batteri è risultato essere il materasso seguito dalla moquette e dalle zone meno usate degli armadi.

Da altri studi è inoltre emerso che una maggiore concentrazione di endotossine nelle polveri, nonché alti livelli di particolato aerodisperso, sono anche correlati alla presenza nelle abitazioni di animali domestici quali cani, gatti e roditori, cioè mammiferi il cui tratto gastrointestinale è tipicamente colonizzato da batteri Gram-negativi (Gereda et al., 2001).

Altre possibili sorgenti di emissione e diffusione di endotossine, di agenti biologici e di particolato organico sono costituite dagli umidificatori, dai condizionatori e dagli impianti di climatizzazione dell'aria centralizzati dove le condizioni di elevata umidità e una eventuale non corretta gestione favoriscono l'insediamento e la moltiplicazione di microrganismi e, quindi, la concentrazione dei prodotti del loro metabolismo che

vengono diffusi nei diversificati ambienti residenziali con la distribuzione dell'aria climatizzata.

La natura lipidica delle endotossine le rende relativamente stabili al calore; l'esposizione prolungata per ore ad una temperatura maggiore di 60°C non consente alcuna perdita di tossicità; la condizione termica necessaria alla loro completa inattivazione è determinata da temperature superiori a 177°C a calore secco per almeno 1 ora (Linee guida AFI, 2007). Il calore secco è una condizione indispensabile alla depirogenizzazione. Da studi effettuati sulla ricerca di endotossine nelle sigarette e nel fumo da tabacco è emerso che un significativo quantitativo di endotossina sopravvive alla temperatura di combustione del tabacco, corrispondente a 177°C, venendo pertanto aspirata attraverso il fumo generato (Hasday J.D., et al., 1999; Larsson et al., 2004).

L'effetto tossico delle endotossine è aspecifico, ma identico qualunque sia la specie batterica dalla quale le endotossine provengono e comunque, non agendo enzimaticamente, la loro azione è meno potente e specifica rispetto, ad esempio, a quella delle endotossine classiche. Tuttavia, i LPS sono uno dei più potenti stimolatori infiammatori a tutt'oggi conosciuti (Hasday JD et al, 1999). Praticamente si può dire che non esiste sistema o funzione dell'organismo che non possa essere interessato dalla loro azione.

L'azione delle endotossine è comunque duplice e richiama la diversa risposta immunitaria ai LPS, tossici a dosi elevate e protettivi a basse dosi. L'attività tossica, quindi, è dose-dipendente ed è stato dimostrato che piccole dosi determinano stati febbrili, mentre effetti molto più gravi sono indotti da dosi massicce (Rietschel e Brade, 1992; Beutler e Rietschel, 2003).

Entrando nel circolo sanguigno provocano innalzamenti febbrili poiché stimolano le cellule ospiti a rilasciare pirogeni endogeni, proteine particolari che colpiscono i centri nervosi deputati al controllo della temperatura corporea causando reazioni biologiche che vanno dalla febbre alla setticemia (Suffredini A. et al 1989; Rietschel E. 1996).

La liberazione di citochine durante il processo infettivo e infiammatorio, provocato dalle endotossine, può inoltre influenzare il comportamento, gli stati d'animo e il funzionamento generale del sistema nervoso centrale (Mullington J. et al., 2000; Raison CL et al., 2006; Cunningham et al 2009; Della Gioia N., Hannestad J., 2010). È stato osservato, infatti, che la risposta infiammatoria dose-dipendente incrementa l'umore negativo e gli stati d'ansia (Grigoleit et al., 2011).

Micotossine

Una particolare rilevanza sanitaria è attribuita alle micotossine prodotte da alcuni funghi che possono costituire un serio rischio per la salute in seguito ad ingestione (32), inalazione (33-35) o a contatto. Le micotossine possono avere effetti acuti, cronici, mutageni e teratogeni e, a causa dei sintomi multipli e dei diversi organi coinvolti, sono state definite come *agent in search of a disease* (36).

Le micotossine possono essere costituite da alcaloidi, ciclopeptidi e cumarine (35), o da strutture aromatiche, fenoliche e terpenoidi (37). Tra le micotossine con struttura aromatica e fenolica vi sono quelle che esplicano i maggiori effetti, ad esempio, le aflatossine, lo zearalenone e la griseofulvina (37-40).

Per quanto le micotossine abbiano generalmente una bassa volatilità e la loro inalazione a livelli significativi non sia molto probabile, non possono essere esclusi fenomeni patologici indotti in caso di massiva inalazione di conidi e successiva colonizzazione dei tessuti da parte dei miceti (41).

DRAFT

8. EFFETTI SULLA SALUTE UMANA

I bioaerosol possono essere costituiti da microrganismi, come cellule batteriche e di lieviti, spore batteriche, di attinomiceti e di funghi; virus, alghe, protozoi, insetti, acari, loro frammenti e loro escrementi, metaboliti e prodotti microbici come endotossine e micotossine; proteine, enzimi, antigeni e allergeni; frammenti di piante. Si tratta quindi di agenti biologici che possiedono le più ampie caratteristiche fisiologiche, di interazione con l'ambiente e l'uomo, di sopravvivenza e di mantenimento nell'aria e nella polvere. Alcuni di essi possono anche dimostrarsi patogeni causando processi infettivi o provocando allergie o intossicazioni.

La valutazione del rischio di esposizione ad agenti biologici risulta per alcuni versi difficile, poiché in microbiologia non esiste il concetto di accumulo pertanto, se un soggetto è esposto ad una data concentrazione di microrganismi, questi non si sommeranno a quelli con cui è già venuto in contatto o con cui potrà successivamente venire in contatto. Piuttosto, in relazione alla presenza di uno specifico microrganismo o di un prodotto del suo metabolismo si potrà avere, da parte del soggetto esposto, una risposta acuta (quindi la manifestazione della malattia) oppure una sensibilizzazione da cui potrà derivare una patologia a carattere immunologico.

Diversi sono gli effetti che possono produrre gli agenti biologici:

- effetti legati alla presenza di patogeni primari e di patogeni opportunisti (gran parte dei microrganismi responsabili delle infezioni ospedaliere);
- effetti legati ad alterazioni della risposta immunitaria per esposizione ad allergeni;
- effetti tossicologici e di immunotossicosi, legati per lo più alla presenza di specie batteriche e fungine che producono tossine (endotossine e micotossine).

In conclusione si può ritenere che il bioaerosol, come vettore di malattie per l'uomo, possa essere responsabile di diverse manifestazioni morbose a carattere respiratorio (infezioni da Adenovirus, legionellosi, micobatteriosi, ecc.), cutaneo (infezioni micotiche, da stafilococco, da streptococco, ecc.), otorinolaringoiatrico (infezioni da virus, da *Pseudomonas*, ecc.), oculistico (amebiasi, infezioni da *Pseudomonas*, ecc.) sistemiche e localizzate in diversi distretti che assumono rilevanza per la facilità di propagazione negli ambienti *indoor*.

Ogni tipo di risposta da parte del soggetto esposto dipende comunque da una ampia serie di fattori, primo tra tutti la sua suscettibilità individuale, quindi la capacità di virulenza dell'agente biologico responsabile nonché la sua concentrazione, modalità di trasmissione e il tempo di esposizione o contatto.

Tabella 1. Focolai di contaminazione e patologie indotte da agenti biologici

Focolai di contaminazione	Agente biologico	Patologie riconosciute
Esercizi di vendita	Miceti: – <i>Penicillium</i> – <i>Aspergillus</i> – <i>Alternaria</i> Attinomiceti: <i>Thermoactinomyces sacchari</i> , <i>T. vulgaris</i> , <i>Micropolyspora faeni</i> , <i>Thermospora alba</i> , <i>Saccaromonospora viridis</i> , <i>T. fusca</i> <i>T. sacchari</i>	Reazioni di ipersensibilità asma bronchiale, alveoliti allergiche, rinite allergica, alterazioni cutanee Pneumopatia del contadino, Alveoliti allergiche
Uomo (bioaerosol: tosse, starnuti, fonazione)	Batteri, virus	Bagassosi Stati influenzali, pertosse, malattie esantematiche, tubercolosi
Impianti di condizionamento e umidificatori	Batteri, funghi <i>L. pneumophila</i>	Irritazione delle vie respiratorie, polmoniti Tosse, cefalea, malessere, nausea, sintomi respiratori
Umidificatori	Endotossine Batteri <i>L. pneumophila</i> <i>Pseudomonas</i> spp. Funghi <i>T. vulgaris</i>	Polmoniti Reazioni allergiche Asma bronchiale
Materiali da costruzione, arredamento (carta da parati, tappeti, moquette)	Funghi <i>Alternaria</i> <i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i> <i>Penicillium</i> <i>Stachybotris atra</i> Batteri Acari	Reazioni di ipersensibilità asma bronchiale, alveoliti allergiche, rinite allergica, alterazioni cutanee

Quadri morbosi di carattere infettivo

Lo studio della qualità microbiologica dell'aria *indoor* prende in considerazione sia la manifestazione di uno stato di malattia dovuto al contagio per via aerea, sia la

condizione di disagio o di malessere dovuta alla presenza di agenti infettivi o patogeni opportunisti nell'aria ambiente. Le indagini svolte in questo ambito riportano di sintomi più gravi in correlazione a malattie di tipo respiratorio e gastroenterico con o senza febbre (riniti, sinusiti, influenze, bronchiti, polmoniti, gastriti ed enterocoliti) e di sintomatologie più lievi (mal di testa, dolori muscolari, disturbi dell'apparato digerente, senso di stanchezza e affaticamento). Queste sintomatologie possono essere associate alla diffusione attraverso l'aria di microrganismi quali: batteri appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, *Flavobacterium*, *Arcobacter*, *Acinetobacter*, *Sarcina*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Acanthamoeba*, *Legionella*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter*, *Calicivirus*, *Norovirus*, nonché *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, attinomiceti, micobatteri e lieviti.

Patologie infettive possono essere causate da microrganismi che trovano nell'ambiente il loro *habitat* naturale e con la contaminazione di impianti ed apparecchiature particolari determinano la *facies* microbica degli ambienti *indoor*. Batteri che possono causare malattie di tipo infettivo appartengono ai generi *Pseudomonas* e *Klebsiella*, agenti microbici che possono rappresentare un rischio elevato in ambienti ospedalieri. Anche le specie *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter agglomerans* e *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus* possono essere implicate in queste patologie e sono spesso diffuse da umidificatori.

È stata ormai da tempo individuata una sindrome pluricausale che si manifesta come un insieme di percezioni multisensoriali accompagnate da sensazione di malessere generale o da una sintomatologia ben precisa caratterizzata da letargia, cefalea, irritazione degli occhi, del naso, della gola, nausea e disturbi respiratori. Questi sintomi possono amplificarsi, o comunque manifestarsi in un numero maggiore di soggetti esposti in ambienti in cui sono in funzione impianti di condizionamento e climatizzazione. La causa di questi sintomi può essere dovuta a fattori fisici tipici dell'ambiente (temperatura, umidità, scarsa ventilazione), ad aspetti psico-sociali, e per implicazione di agenti chimici e biologici, quali composti organici volatili, pollini, acari, miceti e batteri. I loro effetti e sinergie non sono ancora completamente noti e compresi, ma è riconosciuto che la loro presenza può costituire un potenziale rischio per la salute.

Un impianto di climatizzazione, se ben progettato, installato e periodicamente controllato, può risultare utile ed efficace per "diluire" i più comuni inquinanti nell'aria e migliorare la salubrità degli ambienti confinati. E' un sistema che, trattando l'aria, può modificarne le caratteristiche e risulta costituito, generalmente, da un sistema di captazione dell'aria, da un sistema di batterie, dove scorre il fluido termoregolatore, da ventilatori, che mettono l'aria in movimento e le conferiscono spinta nell'impianto, e da un sistema di canali di mandata e di ripresa, da diversi filtri e bocchette d'espulsione.

Nella progettazione di un impianto una particolare attenzione viene rivolta al posizionamento, all'installazione e alla qualità dei filtri, che devono essere collocati

nelle zone più critiche. Alcuni climatizzatori sono dotati, oltre che di filtri standard ad ampia superficie, anche di filtri a carboni attivi per assorbire gli odori, compreso il fumo di tabacco, e trattenere le particelle di impurità fino a 0,01 µm e di filtri elettrostatici passivi per trattenere pollini e batteri.

Errate progettazioni e installazioni, scarsa igiene e inappropriata manutenzione possono tuttavia contribuire a trasformare i climatizzatori da strumenti utili e di comfort a sorgenti di diffusione e amplificazione di contaminanti. Sia la superficie delle griglie di immissione ed emissione, che quella dei filtri e delle tubature sono microambienti che, se umidi, possono diventare siti idonei per la crescita di funghi quali *Penicillium* e *Acremonium*. È stato spesso osservato, ad esempio, che, dopo la riattivazione di sistemi rimasti fermi per un certo periodo di tempo, la concentrazione delle spore fungine nell'aria in uscita può raggiungere valori del 78% superiori rispetto a quella in entrata.

Di norma, in ambienti ben condizionati la carica batterica e fungina diminuisce sensibilmente. Tuttavia, nella zona umida del condizionatore, in genere in corrispondenza delle batterie, si possono creare condizioni microclimatiche ideali per la formazione di siti di colonizzazione di funghi e batteri e lo sviluppo di spore. Tra i miceti isolati più frequentemente negli impianti si riscontrano *Aureobasidium*, *Fusarium* e *Phialophora* spp, comuni funghi ambientali.

Aspergillus, comune ambientale, può sopravvivere facilmente nei filtri dei sistemi di condizionamento dove, detriti di vegetali, insetti e prodotti del metabolismo possono rappresentare un adatto substrato di crescita. Può essere responsabile di patologie infettive, come anche dell'aspergillosi broncopolmonare, che si configura in massima prevalenza come una classica infezione ospedaliera, e dell'aspergillosi broncopolmonare primaria allergica, che si manifesta in soggetti precedentemente sensibilizzati.

È stato messo in evidenza che da deumidificatori contaminati sono stati isolati *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, appartenenti alla famiglia delle *Bacillaceae* ad alcune specie di *Pseudomonas*, responsabili di manifestazioni a carico dell'apparato respiratorio con febbre e tosse. Allo stesso modo, il cosiddetto "malessere del lunedì", correlato all'esposizione ad allergeni prodotti dall'ameba *Naegleria gruberi*, si può manifestare con febbre di tipo influenzale, mal di testa, tosse, mialgia, artralgia e dispnea in soggetti che, dopo il fine settimana, rientravano a lavoro. Comunque anche altri microrganismi possono essere implicati in tale patologia, perché ritrovati in umidificatori contaminati o perché inducono sieroconversione: *B. subtilis*, *Acanthamoeba*, *Polyphaga* ed endotossine da batteri Gram-negativi.

È riconosciuta la diffusione di microrganismi attraverso l'aerosol prodotto da docce, rubinetti, fontane, sistemi di idromassaggio che possono essere responsabili di casi di infezione da *Legionella*, micobatteri e potenziali patogeni che hanno il loro habitat naturale nelle acque.

Quadri morbosi di natura allergica

L'allergia o atopia è una patologia ad eziologia multifattoriale, il cui sviluppo è determinato da una combinazione di cause ereditarie ed ambientali. Il tasso di prevalenza delle allergie, stimato intorno al 20-30% nei paesi industrializzati, è in continuo aumento come dimostrato da studi epidemiologici. Per spiegare questa tendenza sono stati chiamati in causa diversi fattori, tra cui i cambiamenti ambientali, quali clima e inquinamento atmosferico, un marcato miglioramento delle condizioni igieniche ed il miglioramento della sensibilità dei metodi diagnostici. Le manifestazioni patologiche legate all'allergia sono un'importante causa di morbilità e di mortalità costituendo quindi un importante problema di salute pubblica, con elevati costi socio-economici sia diretti (mezzi diagnostici, farmaci, ospedalizzazione e trattamenti di emergenza al pronto soccorso), che indiretti (perdita di giornate lavorative e scolastiche, costi di adattamento ambientale nei luoghi lavorativi e nelle abitazioni).

Le manifestazioni cliniche dell'atopia sono legate a molteplici fattori che possono essere distinti in fattori propri del soggetto (genetica, sesso, età) e fattori ambientali (esposizione agli allergeni, inquinamento atmosferico, esposizione ad infezioni batteriche, virali e parassitarie).

L'esposizione protratta ad alte concentrazioni di sostanze allergizzanti rappresenta il principale fattore predisponente all'instaurarsi di allergopatie; infatti è ormai universalmente accettato che l'esposizione agli allergeni è una *conditio sine qua non* della sensibilizzazione e che esistono molte situazioni in cui i benefici causati dal miglioramento del controllo ambientale sono innegabili. Quando la reazione allergica è immediata e drammatica, il paziente può facilmente stabilire la relazione tra esposizione e sintomi e pertanto mettere immediatamente in atto idonee strategie di controllo ambientale, ad esempio evitando abitazioni in cui siano presenti gatti o adottando idonee misure preventive di rimozione delle potenziali fonti allergeniche. In altre situazioni si può però verificare che la reazione sia ritardata, correlata ad esposizioni multiple o le cui fonti sono difficili da identificare se i sintomi sono cronici. In questi casi è ovviamente più complicato stabilire la relazione tra esposizione e sintomi (William R. Reisacher, 2011).

I sintomi causati dall'esposizione agli allergeni *indoor* interessano soprattutto le vie inalatorie e respiratorie e le patologie maggiormente diffuse sono pertanto rappresentate da malattie respiratorie ed asma.

L'asma è una patologia che colpisce almeno 300 milioni di persone nel mondo ed è influenzata da fattori multipli inclusi l'ambiente, la genetica, le infezioni e la dieta. La sensibilizzazione agli allergeni ha un ruolo importante nello sviluppo, nella severità e nel trattamento di tale patologia. I pazienti con asma di tipo allergico o con sensibilizzazione IgE-mediata agli allergeni hanno maggiore probabilità di sviluppare asma cronica e persistente. Numerosi studi anche recenti, hanno inoltre dimostrato che la sensibilizzazione ad allergeni derivanti da acari, blatte, muffe e peli di animali rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo di asma. Alla base del ruolo degli

allergeni nell'asma c'è l'assunzione che l'aumento della esposizione può indurre la sensibilizzazione e la successiva riesposizione agli allergeni, in un individuo già sensibilizzato, può aumentare il rischio di sviluppo di asma e di altre patologie allergiche. C'è da sottolineare che tale rischio è tanto maggiore quanto inferiore è l'età del paziente, quindi i soggetti più a rischio sono rappresentati da bambini in età pediatrica e gli ambienti da tenere sotto stretto controllo per la riduzione del contenuto di allergeni al di sotto dei valori di rischio sono, oltre alle abitazioni, anche asili nido e scuole. Tali considerazioni, supportate dagli studi finora disponibili, portano alla conclusione che il mancato controllo degli ambienti per quanto riguarda il contenuto allergenico causa indirettamente una spesa elevata per il Sistema Sanitario Nazionale in termini di costi diretti ed indiretti. Tali costi sono dovuti all'utilizzo di una quantità maggiore di farmaci, da più alti tassi di ospedalizzazione e visite mediche, nonché assenza da scuola o dal lavoro, ecc.

In tutti i casi la prevenzione primaria, che implica evitare il contatto con gli allergeni (*allergen avoidance*), rappresenta un aspetto importante nel miglioramento dei sintomi e nel ridurre gli attacchi di asma, così come nel miglioramento dell'asma cronica. Ovviamente, oltre ad evitare il contatto con gli allergeni, fattore basilare per la gestione del paziente allergico, gli altri due aspetti fondamentali sono rappresentati dalla terapia farmacologica e dalla immunoterapia.

Una riduzione del contenuto allergenico che possa avere una certa efficacia per i pazienti coinvolge un approccio complessivo mirato alla rimozione di tutti gli allergeni a cui sono esposti, nonché al miglioramento degli altri parametri ambientali, sia climatici (temperatura, umidità relativa ecc.), sia associati ad altri inquinanti (biologici, chimici e fisici) che possono indirettamente influenzare le condizioni di salute del paziente allergico. La relazione tra l'esposizione agli allergeni durante l'infanzia e lo sviluppo di asma è attualmente un'area di ricerca molto attiva (Sachin N. Baxi e Wanda Phipatanakul, 2010).

In conclusione, per tutte le ragioni esposte, effettuare negli ambienti *indoor* appropriati controlli relativi al contenuto allergenico è di fondamentale importanza soprattutto per la popolazione a rischio sia al fine di salvaguardare le condizioni di salute dei soggetti stessi che per ridurre le spese a carico del Sistema Sanitario Nazionale. Ovviamente uno degli aspetti più importanti è rappresentato dall'utilizzo di approcci idonei e metodiche convalidate, come verrà descritto in seguito, per ottimizzare le risorse e l'efficacia degli interventi mirati a ridurre il contenuto allergenico e a migliorare le condizioni di vita dei pazienti e, più in generale, della popolazione pediatrica e adulta. Non si entrerà in tale documento nel merito degli interventi mirati a ridurre il contenuto degli allergeni negli ambienti *indoor*, esistono in ogni caso numerosi documenti in letteratura che ne suggeriscono alcuni per ciascuna fonte allergenica *indoor* più diffusa (Berrylin J. Ferguson, 2008; Platts-Mills T *et al*, 2007; Reisacher W.R., 2011).

DRAFT

9. INDICI DI CONTAMINAZIONE MICROBICA

I microrganismi hanno una presenza ubiquitaria e sono in grado di sfruttare un'infinità di substrati per sostenere il proprio metabolismo. Negli ambienti di vita dove non vengano accumulati oggetti o prodotti particolari, né vengano svolte particolari lavorazioni, l'apporto microbico dipende principalmente dall'introduzione e dalla movimentazione di persone, animali, alimenti o suppellettili. Anche la presenza di impianti tecnologici, le caratteristiche di diffusione dell'aria, anche proveniente dall'esterno, ed in misura minore le specifiche dei materiali propri dell'ambiente stesso possono influenzare le caratteristiche di qualità dell'aria *indoor*.

Per individuare indici di contaminazione che permettano di definire le caratteristiche microbiologiche di ambienti *indoor*, quindi, le analisi dell'aria dovrebbero prendere in considerazione alcuni parametri da utilizzare come termini di riferimento:

- presenza e attività di persone e animali;
- capacità di sopravvivenza dei microrganismi in relazione alla tipologia delle condizioni ambientali;
- circolazione dell'aria e stato di efficienza e manutenzione degli eventuali impianti di climatizzazione;
- disponibilità di metodi adeguati di prelievo e controllo del bioaerosol, anche in vista di indagini protratte nel tempo.

Il numero di microrganismi con cui si può venire in contatto negli ambienti *indoor* è estremamente vario ed elevato e, per molti microrganismi, è scarsa l'informazione relativa alla loro infettività, mentre per altri, invece, la dose infettante minima è nota e stimabile intorno a poche unità.

Scarse sono, inoltre, le informazioni disponibili riguardanti la variabilità della risposta individuale all'esposizione microbica da non permettere la definizione di limiti di esposizione accettati dalla Comunità Scientifica Internazionale, e utilizzabili come valori soglia (ACGIH, 1999).

A livello europeo, tuttavia, un gruppo di lavoro coordinato dall'Unione Europea (European Collaborative Action), definendo categorie di inquinamento dell'aria per gli ambienti confinati, ha formulato proposte orientative di contaminazione batterica e fungina (Tabella 2) che potrebbero consentire di valutare la qualità dell'aria *indoor*; tali valori non implicano comunque un giudizio di rischio per i soggetti esposti (ECA-IAQ, EUR 14988 EN, 1993).

Tabella 2. Valori di carica microbica e relativa qualità dell'aria (da European Collaborative Action , 1993)

Categoria inquinamento	Abitazioni		Ambienti non industriali	
	Batteri UFC/m ³	Funghi UFC/m ³	Batteri UFC/m ³	Funghi UFC/m ³
Molto bassa	< 100	< 50	< 50	< 25
Bassa	< 500	< 200	< 100	< 100
Intermedia	< 2500	< 1000	< 500	< 500
Alta	< 10000	< 10000	< 2000	< 2000
Molto alta	> 10000	> 10000	> 2000	> 2000

A livello italiano, per la misura dell'inquinamento microbico in ambienti *indoor*, da alcuni autori sono stati proposti degli indici di contaminazione: globale (IGCM), da batteri mesofili (ICM) e di amplificazione (IA), finalizzati a fornire una valutazione semi-quantitativa dell'inquinamento microbiologico aereodiffuso. (M. Brunetti, et al., 2002; C. Dacarro, et al., 2000).

Indice di contaminazione globale – IGCM

Dato che molteplici sono le categorie microbiche che generano l'inquinamento microbico in ambienti *indoor*, l'IGCM, ottenibile a valle dei risultati delle cariche batteriche e fungine complessive rilevate mediante campionamenti attivi di bioaerosol, viene determinato sommando le UFC dei batteri eterotrofi per metro cubo d'aria, determinate a 37°C (batteri mesofili) e quelle cresciute a 20°C (batteri psicrofili), con le UFC fungine per metro cubo d'aria, determinate a 20°C.

Indice di contaminazione da batteri mesofili – ICM

Il solo rapporto tra la carica batterica a 37°C e quella a 20°C fornisce l'ICM che consente di valutare la componente di batteri di origine umana e animale che possono includere anche specie potenzialmente patogene e fornisce importanti indicazioni per quanto attiene l'efficienza dei ricambi d'aria negli ambienti *indoor*. Infatti, un normale ambiente *outdoor* soggetto a ventilazione naturale ha come condizione di normalità la prevalente presenza di batteri psicrofili (ICM <1), mentre in ambienti confinati, sovraffollati e con scarsa ventilazione verrà sempre rilevata una contaminazione da mesofili (ICM >1).

Indice di amplificazione della contaminazione microbica – IA

Il rapporto tra IGCM per metro cubo d'aria valutato all'interno e l'IGCM per metro cubo d'aria valutato all'esterno dell'ambiente da monitorare fornisce l'IA che permette di analizzare le differenze tra interno ed esterno dei livelli di contaminazione.

Parametri microbiologici

Data l'eterogeneità dei biocontaminanti che contribuiscono alla formazione del bioaerosol, nonché la complessità dei tanti fattori implicati, che rendono difficile la caratterizzazione della matrice aria, per stimare la salubrità di un ambiente *indoor* si ricercano generalmente, se non altrimenti stabilito, microrganismi specifici, o aggregati coltivabili di microrganismi, utili a delinearne le caratteristiche di qualità, soprattutto a causa dell'impossibilità di determinare nell'aria, come sulle superfici, la presenza di specifici patogeni, con analisi routinarie.

Nel termine "microrganismo" è compreso anche il termine "agente biologico". Quindi la tipologia dei microrganismi da ricercare nei vari ambienti *indoor*, se presenti e in quali concentrazioni, ne vanno propriamente a delineare il quadro e la criticità, traducendosi in parametri microbiologici quantitativi e/o qualitativi e quindi indici di contaminazione (Direttiva 90/679/CEE).

Con tale finalità, per definire i parametri microbiologici da determinare sarà necessario definire un piano di monitoraggio che tenga conto di:

- tipo e caratteristiche dell'ambiente *indoor* da investigare;
- attività che vi si svolgono;
- tipologia dei frequentatori dell'ambiente da valutare (adulti, bambini, animali);
- caratteristiche dell'*outdoor*.

Per l'analisi quantitativa di *routine* i parametri microbiologici da ricercare saranno:

- Carica Batterica Psicofila totale: batteri con crescita intorno ai 22°C (intervallo 15-30°C), quindi considerati indicatori di contaminazione microbica ambientale;
- Carica Batterica Mesofila totale: batteri con crescita intorno ai 37°C (intervallo 25-40°C), quindi considerati indicatori di contaminazione di origine umana o animale;
- Carica Fungina totale: muffe e lieviti, indicatori ambientali molto importanti, spesso correlati ad un'elevata umidità e polverosità, ridotta ventilazione e scarsa qualità dell'aria.

Un'analisi qualitativa potrà essere valutata attentamente sulla base dell'obiettivo di ricerca che deve essere raggiunto. È possibile, pertanto, investigare sulla presenza di:

- batteri Gram-positivi, in particolar modo appartenenti al genere *Staphylococcus* spp (*S. aureus*), poiché indici di contaminazione antropica; Enterococchi/Streptococchi fecali che, sopravvivendo in condizioni ambientali difficili, sono indici di una contaminazione di origine sia ambientale che fecale;
- batteri Gram-negativi, produttori di endotossine. Tra essi possono essere ricercati i batteri appartenenti al genere *Pseudomonas* spp (*P. aeruginosa*), in grado di fornire informazioni di massima sulle condizioni ambientali, per la loro capacità di adattamento, sopravvivenza e di moltiplicarsi anche in

condizioni ambientali estreme, divenendo valido indicatore della presenza di batteri Gram-negativi vitali ma difficilmente coltivabili; *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*), indicatori peculiari di contaminazione fecale, possono fornire indicazioni sui livelli di contaminazione connessa allo stato igienico-ambientale;

- attinomiceti indice di una scarsa qualità dell'aria poiché correlabili a polvere, umidità e ventilazione ridotta.

Relativamente ai virus va considerato che non esiste per questo parametro un indicatore di contaminazione virale, data l'estesa varietà di specie, la peculiare patogenicità e il fatto che la presenza/assenza di un patogeno non indica la presenza/assenza di altri patogeni virali. Ogni virus è, pertanto, "indicatore" di se stesso con variabilità di concentrazione spazio-temporali e di specie e la loro ricerca ad hoc può essere approntata, tuttavia, a valle di situazioni critiche conclamate.

DRAFT

10. CRITERI DI CAMPIONAMENTO

Tecniche di campionamento e analisi

I criteri di indagine impiegati per la valutazione dell'aria *indoor* derivano da quelli utilizzati per la valutazione delle caratteristiche di qualità degli ambienti industriali. Le indagini possono essere programmate per edifici nei quali sono stati segnalati problemi, oppure mirate allo sviluppo di metodi di controllo dei fattori che condizionano la qualità dell'aria interna.

L'approccio metodologico al problema è costituito da due diverse fasi: la fase del sopralluogo e della raccolta di dati relativi all'ambiente da indagare e la fase del monitoraggio vero e proprio; nel corso di quest'ultimo, prima dovranno essere ricercati gli indicatori che consentono di valutare globalmente la qualità dell'aria, in seguito dovranno essere effettuate misure di approfondimento per quanto emerso nel corso dell'indagine.

Le caratteristiche del monitoraggio, cioè su che cosa si investiga, dove, per quanto tempo e con quale periodicità e con quali procedure, sono determinate dalla tipologia e destinazione d'uso degli ambienti, dal tipo di inquinanti si presume possano essere presenti e dalle sorgenti di contaminazione individuate, tenendo in considerazione anche il contributo apportato dall'aria esterna ai costituenti complessivi del bioaerosol *indoor*. Nei due tipi di ambiente, *indoor* e *outdoor*, il metodo attualmente più idoneo e utilizzato è quello della classificazione delle specie maggiormente rappresentate dal punto di vista quantitativo. (58).

Determinanti alla definizione della qualità dell'aria *indoor* sono la scelta dei punti di campionamento, il tipo e la durata del campionamento, il numero dei campioni, la valutazione degli eventuali cambiamenti delle condizioni ambientali durante il campionamento e le tecniche da utilizzare per l'analisi (9).

Un campionamento ottimale di un ambiente *indoor* dovrebbe svolgersi al centro del locale da monitorare e deve considerare l'ubicazione di finestre, porte, irraggiamento solare (luce naturale), presenza di correnti d'aria per ventilazione naturale o artificiale che possono influenzare l'esito del campionamento stesso. In caso di presenza di sistemi di condizionamento è utile, inoltre, effettuare campionamenti anche a circa 50 cm dalle bocchette di spinta dell'aria e sopra il *fan-coil*.

In considerazione di tali elementi, la scelta del sistema di campionamento è pertanto dettata dalla tipologia particolare di bioaerosol in essere che va a determinare, quindi, anche la specifica tecnica analitica.

La scelta della metodica analitica, che dipende non solo dal tipo di agente biologico da rilevare ma anche e soprattutto dalla sua presunta concentrazione, può richiedere una prova preliminare di campionamento che, compiuta per aspirazione, può permettere di convogliare un determinato quantitativo di aria direttamente su un substrato nutritivo solido per la crescita microbica o in un mezzo liquido da sottoporre

successivamente ad analisi. Per il rilevamento degli agenti biologici raccolti mediante campionatori aspiranti aria, o prelevati dagli impianti di condizionamento e di ventilazione, in alcuni casi può essere necessaria una fase di arricchimento, per consentire il superamento delle condizioni di stress eventualmente subito dalle cellule microbiche durante il campionamento e per favorirne la “rivitalizzazione”.

Nel corso dell’analisi microbiologica, quindi, il campionamento ideale dovrebbe poter determinare:

- il numero totale di particelle aerodiffuse per unità di volume d’aria (UFC/m³);
- il numero medio di cellule viventi per particella.

Tutto ciò comporterebbe il prelievo di un campione sufficientemente rappresentativo della totalità dei microrganismi presenti nell’aria in quel momento, senza introdurre condizioni di stress che possano influenzare la vitalità degli organismi catturati.

Inoltre, i terreni nutritivi usati per le analisi (solidi o liquidi) dovrebbero garantire una crescita ottimale dei microrganismi, evitando l’insorgenza di effetti antagonisti legati alla presenza di interferenze nutrizionali o metaboliche.

È necessario, a tal proposito, considerare che lo stato di aerosol e le diverse tecniche di campionamento, in realtà già determinano una condizione di stress che può compromettere la vitalità e quindi la capacità dei microrganismi di riprodursi in terreno di coltura. Questa condizione comporta una sottostima del rischio biologico.

Combinando l’uso di sistemi-campionatori diversi è possibile determinare un più vasto spettro di microrganismi aerodispersi, ottenendo risultati più attendibili riguardo la complessa componente microbica presente in un determinato ambiente *indoor*. (Frankel M. et al., 2012).

In ogni caso si dovrà tener conto che, confrontando le conte dei microrganismi aerodispersi raccolti con tecniche diverse, si troveranno sempre delle variazioni di concentrazione per effetto sia della loro distribuzione non uniforme sia delle procedure di prelievo e analisi.

Infatti, quasi mai è possibile accertare con precisione l’origine delle emissioni e tantomeno riuscire a valutarne costanti di tipo qualitativo o quantitativo. Le notevoli differenze che si ritrovano nei dati riportati dai numerosi studi in letteratura, al di là delle obiettive diversità fra le metodiche e le condizioni ambientali, portano a concludere che non sono a disposizione validi modelli in grado di descrivere come gli aerosol microbici si disperdano, pur sapendo che si muovono spostandosi nella direzione delle correnti d’aria in cui si trovano. Non si è neppure in grado di prevedere come le particelle che costituiscono un bioaerosol si diluiscano nel tempo ma sembrerebbero avere, in particolare nell’ambiente *outdoor*, la tendenza a rimanere in qualche modo aggregate comportandosi come una serie di piccole “nubi”. Questo spiegherebbe le irregolarità risultanti nei conteggi che sembrano scaturire da un modello di diffusione a macchia di leopardo, irregolarità che, estendendo i tempi di prelievo ed aumentando i volumi di campionamento potrebbe essere superata ma che verrebbe, tuttavia, a incidere sulla vitalità dei microrganismi.

Infine, la pianificazione statistica delle indagini ambientali mirate alla determinazione dei bioaerosol resta un compito molto complesso e difficile. Ciò è dovuto alla interazione delle diverse condizioni ambientali con le proprietà specifiche di ogni sistema di campionamento e dei diversi microrganismi presenti. Le stesse sorgenti, poi, non presentando mai caratteristiche di uniformità, producono relazioni non lineari e distribuzioni difficilmente normali. Da ciò consegue che nella maggior parte dei casi è necessario utilizzare, per quanto possibile, metodi statistici non parametrici per il trattamento dei dati (58).

Campionamento passivo

Il campionamento di tipo passivo o gravitazionale prevede la raccolta di particelle microbiche utilizzando capsule di Petri, contenenti terreni di coltura, esposte all'aria per tempi predeterminati **(10)**: su di esse i microrganismi, veicolati dalle particelle in sospensione nell'aria, si raccolgono per sedimentazione. Dopo opportuna incubazione delle piastre, si procede alla conta del numero di colonie cresciute (UFC). L'efficienza di raccolta dipende dalle caratteristiche aerodinamiche delle particelle e dal grado di ventilazione dell'ambiente.

Il metodo di campionamento per sedimentazione è utilizzato soprattutto per il monitoraggio dell'inquinamento microbiologico di ambienti che devono essere poco inquinati come le camere operatorie e le camere aseptiche, poiché permette la stima diretta del numero di microrganismi che si depositano sugli oggetti ivi presenti.

Il metodo passivo ha, tuttavia, lo svantaggio notevole di non essere quantitativo, infatti non permette di correlare il numero di microrganismi raccolti ad un volume noto di aria, inoltre, essendo il tasso di deposizione in funzione della massa posseduta, sovrastima i microrganismi di dimensioni maggiori **(10) (11)**.

Il metodo per gravità non è considerato quindi un metodo di raccolta ideale, perché influenzato dalla dimensione e dalla forma delle particelle, dalla temperatura dell'ambiente e quindi dai moti convettivi e dalle correnti d'aria nell'atmosfera circostante **(12)**.

Rispetto al campionamento volumetrico (attivo) dell'aria, ha l'indubbio vantaggio di essere più semplice ed economico. Tuttavia la sua sensibilità è inferiore rispetto all'altro tipo di campionamento in quanto, a parità di condizioni, rileva una carica batterica ambientale ridotta, fornendo solo un indice indiretto della probabile contaminazione presente.

Campionamento attivo

Il campionamento di tipo attivo consente l'aspirazione di grandi volumi di aria, minimizzando le differenze di distribuzione dei batteri dovute alle correnti, alla temperatura e alle dimensioni degli aggregati aerodispersi; l'aria raccolta viene poi

convogliata su un substrato nutritivo e dopo un idoneo periodo di incubazione si possono contare e identificare le colonie che sono cresciute. Il grado di contaminazione microbica si esprime come Unità Formanti Colonia per metro cubo di aria campionata (UFC/m³) **(10)**.

Esistono in commercio diversi modelli di campionatori attivi, basati su vari principi di funzionamento: campionatori per impatto, per filtrazione e per gorgogliamento.

I principali campionatori attivi sono distinti, inoltre, in campionatori con sistema aspirante esterno e campionatori con sistema aspirante integrato.

Le due tipologie di campionamento descritte (passivo e attivo) non devono essere considerate contrapposte, ma occorre considerare che ai fini di una migliore valutazione della qualità dell'aria, l'utilizzo contemporaneo delle due metodiche potrebbe consentire di ottenere un maggior numero di informazioni circa il numero e il tipo di microrganismi presenti e sulla cinetica della loro distribuzione.

DRAFT

11. CAMPIONAMENTO DALL'ARIA

Il campionamento del bioaerosol può essere effettuato per numerosi e diversi scopi scientifici (epidemiologico, tossicologico, botanico, fisiopatologico, medico legale, allergologico). Prima di iniziare la ricerca è importante stabilire l'obiettivo che si vuole raggiungere e con esso varierà, a seconda delle particelle che si vogliono identificare (pollini, batteri, spore, miceti, particelle inorganiche, organiche), l'utilizzo che si intende fare dei dati ottenuti (controlli, monitoraggio, correlazione causa effetto ambiente-paziente). Inoltre, sarà utile stabilire se sia necessario effettuare i prelievi nell'ambiente *indoor* o *outdoor* e se si intenda completare l'indagine, qualora se ne ravvisi la necessità, con un campionamento personale.

Per meglio valutare il grado di inquinamento di un ambiente *indoor*, occorre effettuare un'analisi di tipo quantitativo; tuttavia nel corso delle indagini possono essere condotte analisi sia di tipo qualitativo (definendo il tipo di particella) che di tipo quantitativo (misurando le variazioni di concentrazione atmosferica di una determinata particella) per la determinazione di uno o più agenti di cui si sospetta la presenza.

In ogni caso, è sempre molto importante scegliere la modalità di campionamento più adeguata che permetta ai microrganismi aerodispersi di aderire al substrato di isolamento, moltiplicarsi e formare colonie visibili ad occhio nudo **(10)**.

Per il punto di prelievamento nei campionamenti *indoor*, è utile fissare le misure di altezza e distanza dagli ostacoli.

Qualora si debba mettere in correlazione la concentrazione microbica e la possibilità della sua inalazione durante l'esposizione, i campionatori dovranno essere posizionati ad un'altezza media pari a m 1,5 da terra per simulare l'altezza delle prime vie respiratorie umane.

Il campionamento microbiologico dell'aria presume la cattura della componente corpuscolata dell'aerosol, contenente la frazione biologica che si intende evidenziare.

La raccolta delle particelle aerodisperse può essere ottenuta mediante l'impiego della forza inerziale e di gravità, come nel caso del campionamento passivo, oppure tramite un flusso prodotto da un sistema di aspirazione, dotato di controllo e definizione della portata e dei volumi di aria, come nel caso del campionamento attivo **(13)**.

Nel campionamento di tipo passivo (per sedimentazione o gravimetrico), le particelle vengono raccolte per deposizione naturale su una superficie di una piastra di campionamento di dimensioni note. Tale metodo è utilizzato anche per misurare la velocità con cui le particelle si depositano sulle superfici; la misurazione è espressa come numero di particelle per unità di superficie, ad esempio per metro quadrato, in un tempo unitario.

Il campionamento di tipo attivo (o volumetrico), è invece impiegato per misurare la concentrazione dei microrganismi presenti nell'aria, le particelle sono raccolte

mediante aspirazione e la misura è espressa come numero di particelle per metro cubo di aria aspirata **(6)**.

Data l'esistenza di diverse tipologie di sistemi di campionamento volumetrico, disponibili in commercio e basati su vari principi di funzionamento, di seguito si riporta una descrizione dettagliata di come operano i campionatori per impatto, per filtrazione e per gorgogliamento.

Nel **campionamento attivo per impatto**, le particelle sono forzatamente convogliate su substrati colturali solidi o semisolidi. In questo caso, ogni elemento vitale che si deposita sul substrato determina la crescita di una colonia, anche se la particella contiene più di un organismo.

Tra i campionatori attivi ad impatto si distinguono:

- campionatori a fessura: si tratta di apparecchi che aspirano un noto volume d'aria attraverso una fessura e diretto in lenta rotazione contro la superficie di un substrato colturale agarizzato. Si possono, in questo modo, valutare le variazioni di concentrazione dei microrganismi nel tempo. L'efficienza del campionamento è influenzata dalla distanza tra fessura e agar, apertura della fessura, umidità relativa, portata del flusso di aspirazione e velocità della rotazione della piastra con l'agar. Questo tipo di campionatore, adattato anche per i virus, è stato utilizzato con successo in Canada, durante l'epidemia di SARS del 2003 (22).
- campionatori a stadi sovrapposti con sistema aspirante esterno. Particolarmente rappresentativo di questa tipologia è il campionatore multistadio di Andersen, che presenta il vantaggio, rispetto ai campionatori per gorgogliamento, di discriminare le particelle raccolte dall'aerosol in base alle loro dimensioni. Tale dispositivo, ampiamente utilizzato per i batteri, viene invece utilizzato raramente per il campionamento dei virus. È uno strumento dotato di una portata di aspirazione pari a 28,3 l/min, formato da 6 stadi sovrapposti e collegati in serie, ognuno composto da un sottile disco traforato che poggia su una piastra Petri con terreno agarizzato. L'area totale dei fori è costante per ogni disco, mentre il loro diametro diminuisce progressivamente passando da un livello all'altro, così che le particelle aspirate vengano via via trattenute e selezionate in ogni stadio, in funzione del loro diametro, e le più piccole raggiungano e si depositino negli stadi inferiori. Per contro, il campionatore multistadio di Andersen è uno strumento di grandi dimensioni, ingombrante che necessita dell'impiego di 6-8 piastre, da maneggiare in asepsi, per ogni ciclo di prelievo (10).
- campionatori monostadio con pompa integrata: sono più maneggevoli rispetto a quelli multistadio; questi sistemi permettono di rilevare la carica microbica aerodispersa con una approssimazione del 70-80%. Gli strumenti disponibili utilizzano fundamentalmente due criteri di intercettazione delle particelle microbiche: l'impatto tangenziale o l'impatto ortogonale dell'aria sul terreno agarizzato.

A impatto tangenziale è il campionatore monostadio di Reuter (Reuter Centrifugal Sampler-RCS) che, a seconda dei vari modelli, aspira 100, 50 o 40 litri di aria per sessione di campionamento e le particelle in essa contenute impattano su una striscia di speciale substrato agarizzato divisa in 34 spazi di 1 cm² ciascuno **(13)**. Tale apparecchio è molto efficiente sebbene la striscia agarizzata tenda velocemente a saturarsi, con possibile sovrapposizione delle particelle e induzione di fenomeni di inibizione, rendendo meno facile la conta e l'identificazione delle colonie. L'efficienza di recupero delle particelle è modesta per quelle di dimensioni pari o minori a 10 µm e potrebbe essere buona per quelle di dimensioni maggiori, come nel caso delle spore fungine. Bisogna considerare, tuttavia, che se nell'aria ambiente è presente una elevata concentrazione di particelle di grosse dimensioni, essa andrà ad impedire l'agevole captazione della maggior parte delle spore fungine isolate causandone una sottostima al dato finale.

- a impatto ortogonale è il *Surface Air System* (SAS). In questo sistema monostadio, l'aria aspirata viene inviata sulla superficie di un terreno di coltura agarizzato specifico per i microrganismi presenti da rilevare. Ciò permette, quindi, di campionare selezionando in partenza i gruppi microbici da quantificare e valutare.

Il SAS è dotato di un aspiratore a portata costante che, in base al modello, può variare da 40 a 180 l/min e pertanto, i volumi da aspirare possono essere definiti e impostati in funzione dei livelli di inquinamento microbico presente e presunto consentendo, quindi, di effettuare campionamenti più mirati **(10)**.

Tale campionatore ha flessibilità di utilizzo e, grazie alla sua portata, comporta tempi ridotti di campionamento con il vantaggio di sottoporre le cellule raccolte a un minore stress da disidratazione. In presenza di elevate concentrazioni microbiche, il SAS potrebbe, tuttavia, determinare una sottostima del rischio biologico a causa di fenomeni di aggregazione microbica sulla piastra **(10)**.

- campionatore MTM (Multi-time monitoring sampler): è un apparecchio dotato di tre unità separate di campionamento, gestite da un temporizzatore che permette di effettuare campionamenti in momenti stabiliti, anche in assenza dell'operatore. Questo tipo di strumento è molto utilizzato nelle sale operatorie.

Il **campionamento attivo per filtrazione** è il sistema comunemente utilizzato per monitorare prevalentemente gli inquinanti di origine chimica presenti nell'aerosol e adattato in seguito anche al monitoraggio biologico.

I campionatori attivi per filtrazione sono anche definiti "raccoltori totali" in quanto possono rimuovere dall'aria tutto il materiale particolato superiore alle dimensioni della porosità del filtro utilizzato.

La metodica si basa, infatti, sull'uso di un mezzo filtrante montato su idoneo supporto e collegato ad un apparato, sebbene voluminoso e poco maneggevole, in grado di aspirare volumi predeterminati di aria. Permette di analizzare con accuratezza

ambienti caratterizzati da un inquinamento microbico sia elevato che molto basso. Il filtro può essere messo direttamente in coltura oppure sottoposto a lavaggio o solubilizzazione per successivi saggi microbiologici o biochimici degli eluati.

I microrganismi prelevati, trattenuti sulla superficie di una membrana filtrante, formano colonie quando il filtro è poggiato su un idoneo terreno nutritivo. Il tempo di imbibizione che intercorre affinché la membrana, per capillarità, sia perfettamente messa in contatto con il substrato di crescita varia da membrana a membrana, essendo fortemente influenzato dal numero, dalla forma e dalle dimensioni dei pori.

L'imbibizione è una fase fondamentale poiché le membrane, a causa del flusso d'aria che le attraversa, tendono a disidratarsi facilmente interferendo sulla vitalità delle cellule campionate **(11)**.

Esistono diverse categorie di filtri:

- membrane filtranti in fibra, costituite da una matrice porosa, ad esempio in vetro, che intercetta le particelle, e utilizzate per analisi gravimetriche di polvere e allergeni;
- membrane filtranti di esteri o di nitrato di cellulosa e membrane in polycarbonato: i filtri di tali tipologie sono contenuti all'interno di capsule sterili di plastica e grazie alla loro struttura porosa trattengono i microrganismi. Il metodo si basa sul principio dell'intercettazione sulla superficie del filtro delle particelle di dimensioni inferiori al diametro dei pori del filtro (variabile da 0,01 a 10 μm);
- membrane filtranti in gelatina: utilizzate per la raccolta di cellule microbiche e virus aerodispersi; hanno una porosità di 3 μm e uno spessore di circa 250 μm . I canali che formano i pori hanno un andamento tortuoso e sono carichi elettrostaticamente, quindi permettono di trattenere particelle anche più piccole di quanto faccia supporre la loro porosità nominale. E' stato dimostrato, infatti, che questi filtri sono fino a 10 volte più efficienti nella cattura dei virus rispetto a filtri in PTFE o in polycarbonato (56;58). Sono disponibili in commercio confezionati singolarmente, pre-sterilizzati e pronti per l'uso in unità costituite da una membrana filtrante e da un porta filtro oppure, contenuti in capsule sterili (*Via-cell*). Diversamente dalle altre membrane, hanno la caratteristica di essere idrosolubili e di costituire così un tutt'uno con il campione che può essere diluito, omogeneizzato e inoculato su terreni agarizzati. La solubilizzazione della gelatina determina la rottura degli aggregati cellulari durante la fase di omogeneizzazione del campione, quindi le conte delle colonie microbiche così ottenute andranno espresse come numero/ m^3 anziché come UFC/ m^3 . In alternativa, le membrane in gelatina possono essere poste direttamente su terreno agarizzato come quelle di acetato di cellulosa. Un'altra caratteristica di queste membrane consiste nel fatto che il materiale di cui sono costituite è friendly per i microrganismi che vi si depositano durante il prelievo. Ciò dovrebbe favorirne la vitalità in campionamenti a tempi prolungati, che risultano, invece, sconsigliati sia perché le membrane tendono a disidratarsi

rapidamente, col rischio di stressare troppo le cellule in raccolta, sia perché un eccessivo assorbimento di umidità dall'aria in filtraggio può alterare o danneggiare la struttura delle membrane stesse. Le membrane in gelatina infatti hanno un intervallo di utilizzo limitato a temperatura ambientale inferiore a 30°C e a umidità relativa inferiore all'85%. Da qui la necessità di conoscere anche dati dei parametri microclimatici.

I **campionatori attivi per gorgogliamento** raccolgono le particelle in un mezzo liquido. Il campionamento, in questo caso, sfrutta soprattutto la forza di inerzia unita alla diffusione dell'aerosol nel mezzo liquido per la rimozione delle particelle dal flusso d'aria, **(13)**. E' molto pratico per la raccolta di aerosol batterici e virali, ma ha lo svantaggio di essere poco efficiente, a causa degli scarsi volumi d'aria che è possibile campionare con questo sistema. Una apparecchiatura molto utilizzata è l'AGI-30 (*All Glass Impinger-30*) con flusso di aspirazione pari a 12,5 l/min. Il campionamento per gorgogliamento, si distingue quindi da quello per impatto, perché i raggruppamenti di microrganismi possono essere disgregati nelle singole cellule per effetto dell'agitazione del fluido di raccolta.

Nei *campionatori Impingers* (con sistema aspirante esterno), il flusso di aria che viene aspirato è fatto gorgogliare in un opportuno mezzo liquido, in cui si raccoglie il particolato aerodisperso. La sospensione liquido/particelle microbiche ottenuta, previa omogeneizzazione e diluizione, viene seminata direttamente su terreno solido, mentre le particelle virali possono essere analizzate direttamente mediante metodi colturali, molecolari o saggi immunologici. L'utilizzo di un liquido di raccolta favorisce la solubilizzazione degli eventuali aggregati microbici sospesi nell'aria, migliora la coltivabilità dei microrganismi stessi e consente la diluizione del campione in caso di elevata concentrazione di contaminanti. Tuttavia l'uso dello strumento risulta poco pratico e la facile evaporazione delle soluzioni utilizzate come mezzo di raccolta, dovuta anche al riscaldamento del mezzo, limita sensibilmente la durata dei prelievi di aria **(11)**. Un'altra caratteristica che ne limita l'efficienza è dovuta agli spruzzi generati dal gorgogliamento che disperdono una certa quantità delle particelle già inglobate nel fluido di raccolta facendole aderire alle pareti dell'ampolla (riaerosolizzazione). Inoltre questa tipologia di campionatori, può risultare inadatta per la raccolta di particelle idrofobiche come le spore fungine **(13)**.

I Biosamplers, campionatori a gorgogliamento, utilizzano un fluido di raccolta altamente viscoso, non volatile (a base di oli minerali) e favoriscono una maggiore efficienza e durata del campionamento. Il danno alle particelle microbiche si riduce sensibilmente durante il campionamento, e rispetto agli impingers tradizionali (a 8 ore) la durata di captazione può essere aumentata di 1-1,5 ore. Dispositivi Biosampler sono stati utilizzati soprattutto per campionamenti dei virus influenzali in diversi ambienti confinati (48-50).

Il **campionamento per precipitazione elettrostatica** è un campionamento di tipo attivo che consente alle particelle di depositarsi su superfici di raccolta aventi carica elettrica di segno opposto, con una velocità proporzionale alla carica ionica ricevuta

all'ingresso dell'apparecchio. Il bioaerosol aspirato viene raccolto facendolo precipitare su un substrato liquido o solido contenuto in piastre Petri, oppure sulla superficie interna di un cilindro. I campionatori elettrostatici consentono di campionare quantità notevoli di aria ma risultano strutturalmente poco maneggevoli, essendo dotati di un generatore di corrente elettrica ad alta tensione.

Il *Large Volume Sampler* (LSV) è uno strumento basato sul principio della precipitazione elettrostatica. È in grado di campionare grandi quantità di aria, arrivando a sopportare flussi di parecchi metri cubi al minuto. L'aria che entra passa attraverso un elettrodo a corona che, mantenuto ad alto voltaggio, ionizza il campione inducendolo a precipitare su una superficie di raccolta avente carica opposta. Tale superficie è ricoperta da un sottile strato di fluido, scelto in funzione del tipo di microrganismo che si intende catturare. La presenza del fluido di raccolta può rappresentare un fattore limitante per l'utilizzo di tale strumento: si possono infatti effettuare solo campionamenti di breve durata a causa della velocità di evaporazione a cui il fluido è sottoposto e per il rischio di contaminazione del fluido stesso nelle fasi di preparazione e allestimento della stazione di campionamento.

Campionamento dei virus

Per quanto riguarda i controlli ambientali di tipo virologico, volti a monitorare l'aria e le superfici in ambienti *indoor*, si debbono affrontare una serie di problematiche legate alle piccole dimensioni dei virus, alle loro basse concentrazioni in ambienti confinati, all'estrema variabilità del valore di concentrazione nel tempo e nello spazio e, soprattutto, alla varietà delle specie virali che possono essere ricercate.

Per i virus, infatti, non esiste un "indicatore", dal momento che ogni patogeno rappresenta solo sé stesso e la sua assenza non indica l'assenza di altri patogeni.

In genere, la probabilità di identificare agenti virali in campioni d'aria e di superfici dipende da tre principali fattori: la concentrazione dei patogeni nella matrice presa in considerazione, l'efficienza del campionamento e la sensibilità del saggio analitico utilizzato.

Una recente rassegna di Verreault e collaboratori ha esaminato oltre 100 lavori pubblicati a partire dagli anni '50, per valutare i metodi di campionamento e analisi più idonei per l'identificazione di virus (limitatamente all'aria *indoor*) (3). Il quadro che emerge mostra una assoluta mancanza di standardizzazione sia per il campionamento (molteplicità della strumentazione e delle tecniche) che per l'identificazione (utilizzo di sistemi cellulari, metodi molecolari, immunosaggi, altri). Gli studi sul confronto dei vari metodi di campionamento mostrano spesso risultati contraddittori e non sono quindi disponibili indicazioni per la scelta tra l'uno o l'altro di essi. Allo stato attuale delle conoscenze, pertanto, risulta impossibile elaborare protocolli standard che descrivano metodi di campionamento dettagliati, virus da campionare, e tecniche analitiche da utilizzare.

Sulla base degli studi disponibili in letteratura risulta che possono essere utilizzati diversi tipi di campionatori attivi, basati su vari principi di funzionamento. Le apparecchiature per la raccolta dei virus sono simili a quelle impiegate per la raccolta di altri tipi di particelle aerodisperse e descritte in precedenza; differenti sono invece i metodi di trattamento e di analisi dei campioni, che richiedono procedure particolari a seconda che si ricerchino virus vivi (metodi cellulari) o genomi virali (metodi molecolari).

I campionatori più utilizzati per la raccolta dei virus in ambienti *indoor* sono quelli ad impatto su superficie liquida o *liquid impinger* che permettono di procedere alla aspirazione di grandi volumi di aria a flusso controllato (3). Si tratta di dispositivi in vetro i cui flussimetri portano l'aria captata a gorgogliare in soluzioni saline tamponate o in terreni di coltura liquidi. In tal modo le particelle virali possono essere direttamente analizzate mediante metodi culturali, molecolari o saggi immunologici. Le trappole liquide, o gorgogliatori, sono particolarmente vantaggiose in quanto evitano sia la disidratazione delle particelle vitali, mantenendo le capacità infettanti dei patogeni. Inoltre, l'utilizzo di un liquido di raccolta favorisce la dispersione di eventuali aggregati microbici e consente la diluizione del campione in caso di presenza di contaminanti. I limiti dei gorgogliatori sono invece rappresentati dalla possibilità di evaporazione e riaerosolizzazione che possono ridurre l'efficienza di raccolta. I dispositivi più utilizzati sono gli impattatori AGI (All-Glass Impingers). Dispositivi AGI-30 e AGI-4 sono stati largamente utilizzati per la determinazione di diversi gruppi di virus *airborne* (3); tuttavia i risultati in termini di efficienze di recupero e comparazione con metodi diversi di campionamento sono piuttosto contrastanti (38-45).

Altri sistemi di captazione utilizzati per raccolta di virus da aerosol sono i dispositivi tipo Biosampler, utilizzati per la prima volta nel 1998 (46); tali sistemi prevedono l'adsorbimento in liquido (soluzioni fisiologiche sterili, terreni di coltura selettivi) con movimento centrifugo e flusso di aspirazione. Rispetto ai campionatori AGI, consentono di campionare per periodi prolungati senza danneggiare le bioparticelle adsorbite e riducono i rischi di riaerosolizzazione delle particelle stesse (47). Dispositivi Biosampler sono stati utilizzati soprattutto per campionamenti di virus influenzali in diversi ambienti confinati (48-50).

Adattati al campionamento di virus sono i campionatori ad impatto su superficie solida, tra i quali il maggiormente utilizzato è il campionatore a fessura *slit sampler*, impiegato largamente durante l'epidemia di SARS del 2003 (22). Le particelle virali campionate con questo sistema, e che impattano sulla superficie solida, devono essere immediatamente risospese in un mezzo liquido.

Anche il Surface Air System (SAS) può essere impiegato nella captazione dei virus ma il tempo di aspirazione deve essere necessariamente breve (1- 4 minuti) per evitare l'accumulo di elevate cariche microbiche (che possono formare aggregati sulle piastre) e determinare l'essiccamento delle piastre stesse. Le piastre, contenenti uno specifico terreno di coltura agarizzato, come ad esempio TSA (agar soia triptico) o LMA (agarosio *low melting*) possono essere eluite, utilizzando per esempio Beef Extract pH 9 e

l'eluato omogeneizzato e chiarificato mediante centrifugazione (51;52;53). Il liquido surnatante può essere inoculato su colture cellulari o analizzato con metodi molecolari.

Infine, tipologie diverse di filtri possono essere utilizzate per la raccolta di virus *airborne* mediante il metodo a filtrazione: filtri di cellulosa (31;54), in teflon (PTFE) (13;55), in policarbonato (56;57). Tuttavia il loro utilizzo è limitato poiché può provocare danni strutturali alle particelle virali. Negli ultimi anni sono stati utilizzati, in alternativa, membrane filtranti in gelatina contenute in capsule sterili. Tali membrane influenzano meno l'infettività dei virus poiché, durante il campionamento, mantenendo un ambiente umido, non sottopongono a condizioni di stress la vitalità dei virus trattenuti. Inoltre i filtri in gelatina sono completamente solubili in acqua, il che permette di coltivare i virus su opportuni sistemi cellulari o individuarli con metodi molecolari. Sono disponibili filtri in gelatina monouso in unità confezionate singolarmente, presterilizzate e pronte per l'uso, ciascuna costituita da una membrana filtrante in gelatina e da un portafiltro. E' stato dimostrato che questi filtri sono fino a 10 volte più efficienti nella cattura dei virus rispetto a filtri in PTFE o in policarbonato (56;58).

Campionamento degli allergeni

Il campionamento dell'aria in campo allergologico viene utilizzato principalmente per il monitoraggio degli ambienti *outdoor*, prevalentemente per valutare la qualità e quantità dei pollini aerodispersi. Negli ambienti *indoor* il campionamento dell'aria è raramente impiegato per scopi allergologici e viene eseguito soprattutto per mettere in evidenza la presenza di muffe e spore e solo occasionalmente di pollini.

Le due metodiche di campionamento dell'aria normalmente applicate sono quelle descritte precedentemente: metodo gravimetrico - sedimentazione e attivo metodo di aspirazione - volumetrico.

Nell'applicazione del primo metodo, vengono utilizzate capsule Petri contenenti il terreno di coltura più adatto alla crescita della specie o del gruppo microbico in esame. La procedura prevede che venga aperta la capsula Petri contenente il terreno di coltura sterile (il terreno va scelto in base al microorganismo che si intende far crescere, ad esempio, particolarmente indicati per la determinazione di lieviti e muffe veicolati dall'aria sono i terreni a base di agar, peptone e glucosio). Tale terreno può essere reso più selettivo per il microorganismo in esame mediante l'aggiunta di antibiotici specifici.

La superficie della piastra viene esposta per un tempo prestabilito, al termine del periodo di esposizione è richiusa e si procede all'incubazione alla temperatura più idonea per la crescita dei microrganismi in esame. Al termine dell'incubazione si procede al conteggio del numero di colonie cresciute. La lettura avviene mediamente dopo ventiquattro ore di incubazione; i risultati vengono espressi in Unità Formanti Colonia per metro quadrato per ora (UFC /m²/ora).

Nell'applicazione del secondo metodo i microrganismi e/o le spore sono raccolte per aspirazione di un volume noto di aria. I campionatori volumetrici sono stati descritti nella sezione precedente.

Per l'ampia gamma di allergeni potenzialmente presenti negli ambienti *indoor*, i metodi di campionamento dell'aria, sia attivi sia passivi, rappresentano un limite per la loro determinazione. Infatti, le procedure di campionamento dell'aria permettono di isolare l'eventuale microrganismo e le spore, ma per avere informazioni su allergeni specifici si devono necessariamente campionare le polveri sedimentate. Ad oggi non sono quindi ancora disponibili sistemi che permettano di dosare l'allergene specifico mediante campionamento dell'aria.

Nei casi in cui si decida di effettuare un campionamento dell'aria in ambienti *indoor* o si decida di affiancarlo a quello di polveri sedimentate, ci sono numerosi fattori che devono essere considerati e tenuti sotto controllo. Essi coincidono, per la maggior parte, con quelli relativi ai campionamenti microbiologici e per il rilevamento di sostanze chimiche. Sono quindi importanti la scelta per il posizionamento del campionatore, la valutazione della variazione dei parametri ambientali (come temperatura e umidità), la durata del campionamento, il numero di campionamenti da effettuare e infine le tecniche utilizzate per l'identificazione e quantificazione degli allergeni.

Come già esposto, il campionamento dell'aria è più indicato in ambienti *outdoor*. Tuttavia nei casi delle cosiddette sindromi da edificio malato o "*sick building syndrome*" o nei casi di edifici chiaramente contaminati da muffe può diventare rilevante valutare la presenza di muffe e, quindi, isolare, identificare e quantificare tali inquinanti. In questi casi, la eventuale presenza di muffe negli edifici contribuisce inoltre a peggiorare ulteriormente la condizione dell'"edificio malato" andando ad aggravare la problematica legata alla concomitante presenza di concentrazioni di inquinanti chimici come i VOCs, composti organici volatili che risultano irritanti per le vie respiratorie e che, nello specifico, conferiscono a tali microrganismi il loro caratteristico odore (Ariano R e Bonifazi F, Cap.10, 2006).

Nell'eventualità di una rilevabile presenza di spore fungine diventa basilare affiancare al campionamento dell'aria anche il campionamento delle superfici, sede di eventuale deposizione, localizzazione e raccolta.

Qualora si dovesse procedere al monitoraggio pollinico, il metodo di campionamento da preferire è quello volumetrico (attivo) mediante l'utilizzazione di un catturatore portatile ad aspirazione tipo Hirst (es. Lanzoni VPPS1000 o Burkard Recording air sampler) il cui funzionamento è analogo a quello per ambienti esterni, (UNI 11108/2004) le cui caratteristiche generali di forma, peso e dimensioni, lo rendono particolarmente adatto ai campionamenti *indoor*. Anche in questo caso valgono le osservazioni su richiamate riguardanti i fattori da considerare per un corretto monitoraggio. Mediante questa metodologia è possibile monitorare sia i pollini sia le spore di *Alternaria*.

In conclusione, volendo effettuare una valutazione critica tra le varie modalità di campionamento, da aria e da superficie, risulta evidente come la prima abbia l'innegabile vantaggio di delineare un quadro più attinente alla reale esposizione essendo in grado di fornire indicazioni circa la concentrazione e la tipologia di allergeni aerodispersi. Tuttavia tale modalità presenta svantaggi che ne limitano molto l'applicazione. In primo luogo negli ambienti in cui l'aria è statica e quindi non soggetta a movimento o ricambio, la quantità di aeroallergeni dispersi è estremamente ridotta e pertanto difficilmente rilevabile, essendo gli stessi prevalentemente sedimentati. Inoltre tali campionamenti, a differenza di quelli da superficie richiedono tempi piuttosto lunghi, variabili dalle 2 alle 24 ore. Non ultimo è da considerare il fatto che allo stato attuale non sono disponibili metodiche convalidate e standardizzate per il campionamento dell'aria per gli allergeni *indoor*, che andrebbero pertanto investigate, giustificate e convalidate. Infine, probabilmente in relazione al fatto che il rapporto vantaggi/svantaggi del campionamento aereo per la valutazione degli allergeni *indoor* ad oggi è sbilanciato verso gli svantaggi, non esistono attualmente quantità di dati sufficienti a provare la correlazione tra livelli aerei degli allergeni e sensibilizzazione o scatenamento dei sintomi. Una correlazione in questo senso è invece stata dimostrata tra la concentrazione degli allergeni nella polvere e sensibilizzazione e/o scatenamento dei sintomi (Platts-Mills TA et al, 1997). Da qui la necessità di acquisire ulteriori dati recenti ed affidabili per aggiornare le conclusioni sull'argomento.

Indipendentemente dalla tipologia di campionamento utilizzata è senz'altro fondamentale, in concomitanza al campionamento, raccogliere una serie di informazioni che possono essere molto utili sia per meglio analizzare i rapporti di causa/effetto tra quantità/qualità degli allergeni *indoor* e patologie respiratorie allergiche ed asmatiche, sia per stilare conclusioni, al termine del lavoro, che siano più dettagliate e complete possibili. Oltre alla data e alla durata del campionamento, nonché ai dati di temperatura ed umidità relativa, tali informazioni dovrebbero riguardare notizie relative ai locali in cui è stato effettuato il campionamento. Nel caso di locali appartenenti ad edifici complessi, dati riguardanti l'epoca di costruzione, le dimensioni, il numero di persone che occupano o che afferiscono alle diverse aree, i sistemi di areazione e riscaldamento utilizzati e la collocazione dell'edificio stesso (rurale o urbana e in quest'ultimo caso, centrale o periferica) sono fondamentali. Inoltre andrebbe riportato qualsiasi evento riscontrato come anomalo, esempio tracce di umidità visibili all'interno dei locali. Tali dati risulteranno fondamentali ai fini di analizzare, in modo appropriato, e basato su una serie di informazioni, le reali condizioni degli ambienti in cui si riscontrano, ad esempio, concentrazioni di allergeni ritenute potenzialmente rischiose per la salute dei soggetti che vi soggiornano. Inoltre, potranno fornire elementi utili a migliorare lo stato in essere, sia intervenendo sulla struttura sia operando al meglio sul microclima (ad esempio, sui sistemi di areazione e riscaldamento) e sulle procedure di pulizia degli ambienti interessati dal campionamento e dalle operazioni di misurazione.

Campionamento delle endotossine batteriche

La determinazione delle endotossine batteriche è stata affrontata e condotta soprattutto in relazione al rischio di esposizione negli ambienti lavorativi industriali. Per tale comparto c'è grande disponibilità di studi effettuati per determinare l'influenza delle differenti tecniche di campionamento e dei diversi metodi di estrazione. È stata, a tal fine, prodotta la specifica norma UNI EN 14031/05 che fornisce linee guida appropriate per la valutazione dell'esposizione alle endotossine batteriche nell'aria negli ambienti di lavoro, comprensiva dei metodi per il campionamento, il trasporto e la conservazione dei campioni (UNI EN 14031/05).

Per quanto concerne, invece, la determinazione delle endotossine in ambienti *indoor* non industriali, c'è carenza di studi a riguardo; gli studi comunque disponibili sono stati condotti con la finalità di poter ottimizzare le metodiche di campionamento, di analisi e di quantificazione, ma a tutt'oggi non è emerso un protocollo ordinariamente accettato e tanto meno standardizzato.

I procedimenti di campionamento e di analisi devono essere, infatti, necessariamente convalidati per garantire un buon recupero di endotossina e per stabilire un protocollo standard indispensabile per poter ottenere, in fase analitica, risultati comparabili tra loro. La tipologia di campionamento adottata e il procedimento di estrazione utilizzato possono influire in maniera significativa sulla determinazione delle endotossine nei campioni di bioaerosol.

Per la determinazione delle endotossine il campionamento può essere effettuato mediante raccolta su filtro o in mezzo liquido. Tutto il materiale impiegato ai fini di questa valutazione deve essere imperativamente e rigorosamente apirogeno.

– Campionamento su filtro

Questa procedura prevede che vengano campionate le polveri aerodisperse inalabili; il flusso di campionamento degli aerosol può variare da 1 a 4,5 litri al minuto. Possono essere utilizzati filtri costituiti di materiali differenti: esteri di cellulosa, cloruro di polivinile (PVC), policarbonato, teflon, fibra di vetro. Alcuni materiali, tuttavia, possono assorbire le endotossine e pertanto dare lettura di false basse concentrazioni. I filtri in fibra di vetro sono quelli che generalmente mostrano recuperi di endotossina più elevati e minore variabilità rispetto alle altre tipologie di filtri.

Al termine del campionamento i filtri devono essere trasferiti, in condizioni di sterilità, in contenitori apirogeni ed essere sottoposti ad estrazione. Se il campione non viene estratto entro pochi giorni dall'arrivo in laboratorio, dovrà essere conservato a – 20°C poiché, anche congelate, le endotossine sono molto stabili. I campioni, comunque, non devono mai essere sottoposti ad azioni ripetute di congelamento-scongelo poiché ciò può influire sul rilevamento della concentrazione reale di endotossina presente nel campione.

– Campionamento in mezzo liquido

Per il campionamento del bioaerosol in ambienti *indoor* può essere utilizzato anche il metodo impinger, basato sul gorgogliamento dell'aria campionata in una matrice liquida nella quale viene a concentrarsi il materiale disperso campionato.

Un esempio è rappresentato dal sistema di campionamento Bio-Sampler che, può essere definito alla stregua di un gorgogliatore ma, rispetto alla tipologia tradizionale, presenta alcuni indubbi vantaggi in quanto consente di ridurre la possibilità di dispersione delle particelle nei vapori di gorgogliamento, di effettuare campionamenti di lunga durata e quindi di amplificare le possibilità di raccolta delle endotossine aerodisperse. Strutturato, inoltre, per impedire l'aerosolizzazione del campione nel peculiare mezzo liquido di raccolta, permette di conservare in condizioni ottimali anche i microrganismi dispersi captati consentendo, quindi, di poter verificare le particelle campionate mediante tecniche analitiche diverse finalizzate, al contempo, sia alla stima delle endotossine che delle cellule microbiche vitali contabili.

In tale sistema, infatti, l'aria campionata viene convogliata, in modo tangenziale attraverso tre micro-ugelli in un liquido di assorbimento inserito all'interno del contenitore di raccolta; ciò determina il diretto deposito delle particelle aerodisperse ed evita eventuali stress o danneggiamenti alle cellule vitali e alle particelle stesse.

Il movimento tangenziale è di fondamentale importanza poiché permette il lento scorrimento delle particelle sulle pareti del contenitore ed evita lo stress del continuo gorgogliare del liquido, azzerando il rischio di una eventuale aerosolizzazione del campione stesso.

Mediante il collegamento del Bio-Sampler ad una pompa di aspirazione portatile tipo Air Cube può essere effettuata la programmazione della velocità di flusso, della durata del campionamento e quindi del volume totale da campionare.

Come mezzo liquido di raccolta viene utilizzata acqua apirogena, in genere a volumi di 10-20 ml, e il flusso di aspirazione solitamente è di 12,5 l/min.

Il campione così raccolto, una volta pervenuto in laboratorio, deve essere stoccato in numerose aliquote multiple all'interno di contenitori apirogeni e conservato a -20°C per effettuare la successiva determinazione delle endotossine mediante il *Limulus Amebocyte Lisate test* (LAL).

12. CAMPIONAMENTO DALLE SUPERFICI

Le superfici possono rappresentare una riserva potenziale di elementi nutritivi in grado di supportare e favorire lo sviluppo di una flora microbica diversificata, disseminata non solo per contatto diretto ma soprattutto attraverso l'aria. Il campionamento delle superfici è importante, pertanto, per conoscere il *fallout* microbico ovvero quella componente batterica e fungina presente nel bioaerosol che va a depositarsi, in maniera prevalente soprattutto quando i ricambi d'aria sono scarsi o assenti.

I metodi a disposizione per valutare lo stato igienico delle superfici sostanzialmente possono essere distinti in metodo microbiologico, chimico e biochimico tutti basati sul presupposto che una superficie, soprattutto qualora correttamente detersa e disinfettata, non deve possedere elevate quantità di quelle molecole ritenute indicatori di uno scorretto grado igienico. Il metodo microbiologico evidenzia la presenza di microrganismi e ne consente l'identificazione richiedendo almeno 24-48 ore per fornire risultati; i metodi chimico (che non necessita di strumentazione) e biochimico (che prevede l'acquisto di uno strumento per la lettura dei risultati) forniscono risultati in pochi minuti, con possibilità di registrazione e rintracciabilità.

Il metodo microbiologico ha la possibilità di essere applicato con numerose tecniche differenti quali il metodo della spugna, dello "slide" flessibile, delle piastre a contatto (per esempio, Compact Dry, Rodac Weight, Maxi Contact Plate), del tampone (*swabs*).

Il metodo della spugna prevede l'utilizzo di spugnette che, imbevute con soluzione sterile, vengono strofinate sulla superficie delimitata da testare, quindi sottoposte a trattamento in Stomacher; dopo omogeneizzazione il campione viene seminato in piastra con la tecnica dell'inclusione in agar. Questa metodica può risultare particolarmente adatta nella ricerca di patogeni, quali ad esempio *Salmonella*, poiché consente di campionare superfici più ampie rispetto ai tamponi o alle piastre a contatto.

La tecnica degli slides flessibili, disponibili in commercio pronti per l'uso, si avvale della compresenza di due diversi tipi di terreno sulle due facce di uno stesso slide permettendo di eseguire due diversi controlli con la stessa piastrina. La flessibilità dello slide favorisce il contatto tra il terreno di crescita e la superficie da testare; la parte sporgente dell'agar viene messa a contatto con la superficie acquisendone l'esatta impronta microbiologica.

Per una veloce valutazione dello stato igienico di una superficie si possono utilizzare i diversi sistemi rapidi, biochimici o chimici, che permettono, rispettivamente, di rilevare la concentrazione dell'adenosintrifosfato (ATP) - molecola ubiquitaria presente in tutti i microrganismi e nelle cellule animali e vegetali - o i residui proteici.

La metodica biochimica consente una veloce analisi attraverso la lettura del valore della bioluminescenza, rilevata impiegando la reazione luciferina-luciferasi; il metodo

chimico dispone di kit che si basano su una reazione chimica che comporta un viraggio di colore in presenza di proteine.

Come già riportato a proposito dei riferimenti normativi sugli aerosol microbici (cap.3), in Italia non esistono linee guida che permettano di esprimere un giudizio di qualità igienica nell'*indoor* quindi, per valutare lo stato di contaminazione delle superfici in questi ambienti, si propone di ricorrere a due procedure analitiche che già in altri campi vengono utilizzate per la determinazione dei microrganismi sulle superfici e che si riportano qui di seguito.

Tecnica delle piastre a contatto

La metodica prevede l'uso di apposite piastre a contatto, preparate con un terreno di coltura idoneo per il parametro da rilevare. Può essere utilizzata su superfici prive di asperità e non discontinue. Il prelievo viene effettuato poggiando la piastra sulla superficie. Al fine di avere maggiore possibilità di recupero e maggiore rappresentatività del dato, è consigliabile effettuare prelievi in triplo sulla medesima superficie in esame e identificare tre punti significativi da campionare per ottenere il dato medio di contaminazione.

Dopo incubazione si procede alla conta delle colonie microbiche cresciute sul terreno agarizzato.

Il metodo non è idoneo per la determinazione di generi e specie patogeni che richiedono fasi di pre-arricchimento e arricchimento.

Il terreno di coltura da utilizzare deve permettere la crescita dei microrganismi in indagine.

Nella preparazione delle piastre con i terreni colturali agarizzati, è necessario avere cura che la superficie del substrato di crescita si presenti leggermente convessa. Se la dispensazione non fosse eseguita correttamente, il campionamento potrebbe essere falsato.

L'aggiunta di agenti quali Lecitina e Tween 80, può consentire un migliore recupero dei microrganismi poiché neutralizzano i residui degli eventuali disinfettanti adoperati.

In alternativa si trovano in commercio piastre da contatto già pronte per l'uso, del diametro di 65÷90 mm, contenenti terreni di coltura idonei per diversi parametri.

Selezionare la piastra con il terreno più adatto in funzione della determinazione da eseguire. Per l'indagine sui batteri eterotrofi, utilizzare due piastre di Agar all'estratto di Lievito per le due diverse temperature di rilevamento, per la determinazione dei funghi utilizzare Sabouraud Dextrose Agar e in caso di determinazione di funghi dermatofiti utilizzare Dermasel Agar. Assicurarsi che le piastre con il terreno agarizzato siano ben asciutte; in caso contrario, porle aperte sotto cappa a flusso laminare fino a completa asciugatura.

Per effettuare il campionamento far aderire il substrato di crescita direttamente alla superficie esercitando una lieve pressione per 10 secondi.

Il trasporto dei campioni deve avvenire in condizioni refrigerate (2÷8)°C affinché non ne vengano alterate le caratteristiche.

Le piastre, appena giunte in laboratorio, devono essere poste a incubare:

- Per il conteggio dei batteri psicrofili incubare le piastre di Agar all'estratto di lievito alla temperatura di (22 ± 1)°C per 72-96 ore in incubatore termostato. L'incubazione può essere prolungata fino a 6 giorni.

- Per il conteggio dei batteri mesofili, incubare le piastre di Agar all'estratto di lievito alla temperatura di (36 ± 1)°C per 48 ore in incubatore termostato.

- Per il conteggio dei funghi incubare alla temperatura di (22÷25) °C in incubatore termostato per (3÷5) giorni.

- Per il conteggio dei dermatofiti incubare alla temperatura di (25÷30)°C in incubatore termostato, effettuando il primo controllo a 48 ore, prolungando l'incubazione fino a 20 giorni e controllando periodicamente per i ceppi a crescita lenta.

Nel corso del periodo di incubazione è utile procedere, prima della scadenza, a controlli periodici della crescita microbica.

Il numero dei microrganismi cresciuti sulla superficie dei terreni di coltura, si calcola come Unità Formanti Colonia (UFC) per cm²:

$$\text{UFC/cm}^2 = \frac{N}{S}$$

dove:

N = numero di colonie contate;

S = superficie in cm² della piastra da contatto utilizzata (ad esempio una piastra da contatto del diametro di 65 mm ha una superficie di 33,2 cm²).

Tecnica dei tamponi

Questo metodo prevede l'uso di tamponi ed è maggiormente impiegato per prelievi da superfici irregolari, ed è particolarmente utile per effettuare prelievi da superfici interstiziali difficilmente raggiungibili con la tecnica delle piastre da contatto. A differenza del metodo delle piastre da contatto il campionamento non è contemporaneo all'inoculo del terreno di crescita, che avverrà successivamente in laboratorio dopo il trasporto in condizioni refrigerate in appositi contenitori.

Il prelievo consiste nello strisciare con tamponi sterili la superficie da saggiare. I tamponi, costituiti da uno stelo rigido (in plastica, legno o alluminio) e da una testa morbida (in cotone, fibra sintetica o alginato) sono molto utilizzati per la versatilità di applicazione su molteplici superfici. I tamponi di alginato di calcio (o simili) sono molto validi in quanto, dissolvendosi completamente in opportune soluzioni, consentono un recupero totale dei microrganismi raccolti. La soluzione ottenuta può essere quindi utilizzata direttamente per l'enumerazione e identificazione del microrganismo

bersaglio. Tale metodo è utile quando il grado di contaminazione atteso è molto elevato (> 100 UFC/cm²). Per l'analisi si esegue la tecnica dell'inclusione in agar.

Il terreno di coltura da utilizzare deve permettere la crescita dei microrganismi bersaglio. È opportuno non utilizzare terreni che contengano sostanze selettive.

Prelevare il tampone sterile dal proprio involucro, inumidirlo con soluzione fisiologica ed eliminare il liquido in eccesso ruotandolo sulle pareti del tubo. Applicare un delimitatore di area (sterile o sterilizzato) della dimensione di 10×10 cm (100 cm²) sulla zona della superficie prescelta e strofinare il tampone sulla superficie delimitata con movimento a zig-zag incrociato. Ripetere l'operazione partendo dagli altri vertici del delimitatore. Trasferire il tampone in un tubo contenente 10 ml di Soluzione fisiologica tamponata o Soluzione salina peptonata.

Per l'eluizione dei microrganismi, sottoporre il tubo contenente il tampone ad agitazione con vortex per almeno 60 secondi. Eliminare il tampone e conservare la soluzione che a questo punto rappresenta il vero e proprio campione da sottoporre a successiva analisi. Se necessario, prima dell'analisi procedere a diluizioni seriali decimali del campione da seminare in triplo.

Prelevare, quindi, 1 mL di campione tal quale o di una sua diluizione e porlo sul fondo in una capsula Petri da 90 mm. Aggiungere il terreno di coltura mantenuto ad una temperatura di 45-48°C ed eseguire delicati movimenti circolatori a capsula chiusa per favorire una migliore distribuzione e crescita dei microrganismi raccolti e lasciare solidificare a temperatura ambiente.

Per la ricerca dei batteri eterotrofi, distinti in psicrofili e mesofili, utilizzare il terreno Agar all'estratto di Lievito e incubare alle rispettive temperature.

Per la ricerca dei funghi utilizzare Sabouraud Dextrose Agar.

Per la determinazione dei funghi dermatofiti utilizzare Dermasel Agar.

Per il conteggio dei batteri psicrofili, incubare le piastre alla temperatura di (22 ± 1)°C per 72-96 ore in incubatore termostato; l'incubazione può essere prolungata fino a 6 giorni.

Per il conteggio dei batteri mesofili, incubare le piastre alla temperatura di (36 ± 1)°C per 48 ore in incubatore termostato.

Per il conteggio dei funghi incubare alla temperatura di (22÷25)°C per (3÷5) giorni in incubatore termostato.

Per il conteggio dei dermatofiti incubare alla temperatura di (25÷30)°C in incubatore termostato, effettuare un primo controllo a 48 ore e prolungare l'incubazione fino a 20 giorni, controllando periodicamente per i ceppi a crescita lenta.

Il numero dei microrganismi cresciuti nei terreni di coltura, si calcola come Unità Formanti Colonia (UFC) per cm²:

$$\text{UFC/cm}^2 = \frac{N \times V \times D}{100}$$

dove:

N = numero di colonie contate;

V = volume di soluzione eluente utilizzata.

D = fattore di diluizione

100 = superficie tamponata corrispondente

Virus

I sistemi utilizzati per il monitoraggio virologico delle superfici sono gli stessi utilizzati per la microbiologia classica, ossia tamponi, spugnette e slides, che vengono sottoposti dopo il prelievo, a successiva eluizione. In alcuni casi vengono usate piastre a contatto.

I protocolli più largamente utilizzati per l'identificazione di virus da superfici sono descritti in una recente *review* di Julian e collaboratori (59 - *bibliografia in sospeso*) che ha messo a confronto i risultati di 59 studi. I tamponi più utilizzati sono quelli in cotone (60% degli studi) e poliestere (16%), seguiti da rayon e altri tamponi antistatici. Per quanto riguarda l'eluizione, gli eluenti più utilizzati sono brodo (beef extract, minimum essential medium, brodo triptosio/fosfato) e soluzione di Ringer. In genere il metodo più efficace per il recupero dei virus è risultato essere il tampone di poliestere preumidificato ed eluito con soluzione di Ringer (concentrazione $\frac{1}{4}$).

Allergeni

Il campionamento dalle superfici è più indicato quando lo scopo del monitoraggio è valutare la presenza di allergeni indoor quali quelli derivanti dagli acari, blatte o scarafaggi, da animali domestici (gatto e cane), roditori e, infine, muffe. Tale approccio consente infatti di valutare anche il fenomeno dell'accumulo, a fronte del valore puntiforme che può provenire dal campionamento dell'aria che da una indicazione invece della quantità in sospensione nel volume di aria campionata. Per quanto riguarda invece le muffe, oltre al dosaggio mediante il campionamento dell'aria che individua il microrganismo vivo, al pari degli altri allergeni possono essere dosati nei campioni di polvere, dopo opportuna estrazione, gli allergeni principali, come descritto di seguito. Infine, per quanto riguarda il dosaggio di allergeni rilasciati da roditori, occorre precisare che tale valutazione può essere particolarmente importante per alcuni ambienti specifici quali ad esempio gli stabulari e in generale negli ambienti in cui tali animali possono essere presenti più facilmente.

La ragione della scelta del campionamento delle superfici è legata ad una serie di fattori; tra i vari, il principale è sicuramente legato al fatto che i principali allergeni indoor, quali ad esempio gli acari, proliferano all'interno di superfici imbottite o comunque costituite da tessuti pesanti (divani, materassi, tappeti e tende). Analogamente, anche i residui di sfaldamento delle blatte si rilevano principalmente nella polvere sedimentata. Analogamente, gli allergeni derivanti dagli animali domestici, come il gatto e il cane, sono veicolati da particelle particolarmente adesive

e, grazie a questa caratteristica, possono aderire facilmente ai capi di vestiario, risultando pertanto soggette al trasporto (*carry over*) da un luogo all'altro mediante gli indumenti delle persone. Questa stessa peculiarità consente a tali particelle di aderire facilmente alla polvere sedimentata. Inoltre, quando le particelle vengono aerodisperse in seguito al rimescolamento dell'aria, causato ad esempio dal movimento che avviene nell'ambiente, dopo breve tempo queste sedimentano nuovamente. Pertanto un'altra delle ragioni per cui è importante effettuare il campionamento delle superfici è legata alla dimensione delle particelle in cui gli allergeni stessi sono contenuti, dimensione che varia generalmente da 5 a 40 μm e che implica quindi che le stesse si possano depositare in tempi rapidi.

Per la raccolta dalle superfici delle polveri sedimentate viene utilizzata solitamente un comune aspirapolvere, la cui potenza massima è di 1800 W. E' richiesta una potenza totale dello strumento superiore rispetto alla potenza d'uso che in genere è 1600 W, in modo tale che lo strumento non lavori in continuo alla massima potenza possibile. Sono inoltre disponibili in commercio beccucci in plastica che possono essere adattati all'estremità del tubo di aspirazione di quasi tutti i modelli di aspirapolvere. Tale beccucci dispongono di un apposito spazio all'interno del quale vengono adattati dei filtri specifici che intrappolano la polvere raccolta dalle superfici. Prima di procedere alla raccolta dei campioni di polvere, è necessario numerare sia il filtro che il sacchetto monouso in cui verrà riposto il filtro dopo aver raccolto il campione di polvere. Va inoltre eseguita la pesata del filtro stesso, annotando il valore della tara su un registro dei campioni.

Dopo aver rimosso il filtro dal contenitore, questo va inserito nel beccuccio adattatore montato in testa al tubo dell'aspirapolvere. Nel corso di tali operazioni e durante il prelievo stesso, l'operatore dovrà indossare camice, guanti e, possibilmente, anche una mascherina protettiva.

Per quanto riguarda il flusso di aspirazione della polvere, si consiglia di standardizzare la velocità di aspirazione regolando la potenza a circa 1600 W. Tale potenza è generalmente equilibrata per raccogliere dei campioni di polvere in modo abbastanza omogeneo. Una potenza più bassa potrebbe non raccogliere efficacemente la polvere presente soprattutto sulle superfici imbottite, viceversa una potenza più alta potrebbe danneggiare il filtro di raccolta che potrebbe essere sottoposto ad una depressione eccessiva. E' inoltre necessario verificare che ci sia un contatto ottimale del beccuccio adattatore sulla superficie che si sta campionando e che durante la raccolta delle polveri non si favorisca l'aerodispersione, ad esempio con il movimento dell'operatore. L'aspirazione deve rigorosamente essere standardizzata sia per quanto riguarda la durata del prelievo che la superficie interessata. Ad oggi sono state utilizzate, in base a dati pubblicati in letteratura, due modalità di campionamento che possono essere applicate in base all'obiettivo del campionamento stesso. Generalmente, se si vuole saggiare l'effetto dell'applicazione di un determinato trattamento anti-allergene, ad. es. un acaricida, è più opportuno limitare il campionamento alla superficie di interesse dove il trattamento è stato effettuato ed

esprimere il risultato in μg di allergene per m^2 per minuto di campionamento ($\mu\text{g}/\text{m}^2/\text{min}$). Quando invece emerge l'esigenza di conoscere quali allergeni sono presenti in un determinato ambiente, è opportuno selezionare alcuni punti in cui è più opportuno campionare in base all'ambiente che si sta esaminando (e ad una eventuale analisi del rischio per identificare le aree potenzialmente più significative) ed esprimere il risultato in μg di allergene per grammo di polvere ($\mu\text{g}/\text{g}$).

La scelta dei punti da campionare è una delle fasi più critiche dell'intero processo poiché i punti selezionati devono essere rappresentativi della carica allergenica realmente presente nella polvere sedimentata dell'ambiente campionato e dello scopo per il quale il campionamento è effettuato. Un altro aspetto da prendere in esame è legato alla influenza di eventuali procedure di pulizia in essere in quello specifico ambiente, che non devono essere incrementate o rese più accurate in corrispondenza del periodo in cui vengono effettuati i campionamenti, pena il rischio di sottostimare la misura determinando una carica allergenica non rappresentativa dell'ambiente in esame. In tal senso, e di nuovo in relazione allo scopo del campionamento, potrebbe essere ottimale un prelievo eseguito prima di qualsiasi forma di pulizia prevista e il più lontano possibile dalla precedente sessione di pulizia eseguita.

Dopo aver effettuato l'aspirazione, si procede al distacco del beccuccio adattatore dal tubo dell'aspirapolvere e alla rimozione del filtro in esso contenuto. A questo punto si procede riponendo il filtro con la polvere nell'apposito contenitore identificato come precedentemente indicato (sacchetto di plastica). Prima di procedere ad un nuovo prelievo è necessario lavare il beccuccio con detergente, risciacquare con acqua corrente, asciugare accuratamente ed inserire un nuovo filtro. I beccucci adattatori possono essere lavati con comuni detersivi ed essere riutilizzati. Si sottolinea che la pulizia dell'aspirapolvere nelle sue parti a monte del filtro in questione non è critica in quanto che il campione raccolto transita esclusivamente attraverso il beccuccio pulito per essere poi immediatamente dopo raccolto nel filtro.

I campioni andranno trasportati a temperatura controllata ($+4^\circ\text{C}$) dal luogo di raccolta al luogo di analisi utilizzando, ad esempio, una borsa-frigo con panetti refrigeranti. Se non si procederà alla fase di estrazione immediata, i campioni di polvere prelevata dai filtri potranno essere conservati a -20°C fino al momento dell'analisi. Prima di riporre i campioni a -20°C è necessario pesare i filtri con la polvere riposti precedentemente nei sacchetti di plastica e riportare sull'apposito registro il peso della polvere raccolta. Il peso del sacchetto di plastica è trascurabile perché è piccolissimo e non influenza il calcolo finale (μg di allergene per grammo di polvere).

Ai fini della idonea conservazione dei campioni è molto importante osservare scrupolosamente la temperatura di conservazione degli stessi.

13. METODI DI ANALISI

È noto che i microrganismi sottoposti a condizioni di stress ambientale, pur continuando a rimanere metabolicamente attivi, possono perdere la capacità di moltiplicarsi in condizioni standard di laboratorio. In questa circostanza lo stato delle cellule è caratterizzato in generale da un ritmo di respirazione ridotto, da una bassa attività metabolica e da una lenta utilizzazione delle risorse energetiche. Pertanto, se si tenta di isolare questi microrganismi, molto spesso essi non vengono rilevati. Questa condizione di quiescenza, fenomeno che si riscontra diffusamente nella microbiologia ambientale, è una prospettiva da non trascurare perché dà un significato dinamico al termine "sopravvivenza" (Bonadonna, 1996).

La capacità dei microrganismi di essere in grado di riprodursi, ha in sé comunque scarsa rilevanza, se il controllo della qualità dell'aria deve verificare la presenza di biocontaminanti atti a provocare reazioni allergiche o tossigene quali le endotossine batteriche, costituite da lipopolisaccaridi specifici della parete cellulare dei batteri gram-negativi, che possono ritrovarsi nell'aria e, in quanto resistenti e stabili, mantenere la loro attività biologica anche dopo la cessazione della vitalità delle cellule batteriche che le hanno prodotte. Inoltre è da sottolineare che, nell'uso di metodi colturali per il controllo dei microrganismi presenti nell'aria *indoor*, ambiente nel quale si trovano dispersi in misura non uniforme e più stressati rispetto a quelli diffusi in altri ambienti quali acqua e suolo, sarebbe opportuno effettuare saggi di efficienza con microrganismi di controllo e di sterilità dei terreni impiegati.

Le principali metodologie di indagine di campioni di aria comprendono metodi di coltura diretta e analisi biologiche, biochimiche ed immunologiche. Nel tener conto che molte specie di microrganismi di origine strettamente ambientale risultano coltivabili con difficoltà sui terreni di laboratorio e che i loro tempi di crescita possono essere molto lunghi, si può considerare l'importanza del contributo delle tecniche di biologia molecolare (sonde, amplificazione del genoma) che mettono in grado di rilevare e distinguere specifici microrganismi anche in assenza di crescita. Tuttavia, sebbene possano essere vantaggiose perché permettono di evidenziare anche i microrganismi non coltivabili, non sono standardizzate, risultano ancora costose e sono comunque tuttora scarsamente applicate nel monitoraggio del bioaerosol.

Con la metodica colturale diretta gli organismi vitali raccolti sul terreno di coltura, direttamente o per mezzo di membrane filtranti, si evidenziano e si enumerano perché si sviluppano in colonie (UFC) e possono essere identificati macroscopicamente, microscopicamente o mediante test biochimici. Questa metodica può essere utilizzata quando il campionamento è effettuato con campionatori filtranti e aspiranti (tipo Andersen) e per enumerare i campioni raccolti dopo eluizione da membrana oppure per analizzare polveri e tamponi prelevati dalle superfici.

Il metodo dell'enumerazione diretta è adatto per evidenziare, oltre alla flora aerodispersa contaminante di base, anche agenti infettivi come stafilococchi e funghi

patogeni, come *Staphylococcus aureus* o *Aspergillus fumigatus*. Purtroppo, spesso le colture in terreno agarizzato forniscono sottostime delle densità reali dei microrganismi presenti negli aerosol. Le cause sono diverse:

- alcuni organismi hanno richieste di crescita molto specializzate. Infatti, per quanto il terreno per la sua crescita possa essere selettivo e specifico, il rilevamento quantitativo può dare risultati negativi o valori più bassi di quelli reali;

- alcuni microrganismi producono sostanze che possono rallentare o inibire del tutto la crescita di altri, che quindi non vengono rilevati;

- una densità eccessiva di microrganismi sul terreno di coltura agarizzato può drasticamente ridurre, sul piano quantitativo, il recupero degli organismi ricercati sia per la presenza di fattori solubili di inibizione, sia per inibizione "da contatto" dovuta a crescita adiacente;

- con i campionamenti effettuati mediante filtrazione dell'aria la disidratazione e la conseguente morte dei microrganismi durante il periodo di campionamento possono diventare significativi e ridurre, in questo caso, il numero rilevato.

L'enumerazione delle colonie batteriche e fungine può essere agevolata mediante appropriati contacolonie. Sia l'enumerazione che la successiva identificazione delle colonie cresciute sul terreno di coltura dovrebbe essere effettuata secondo le indicazioni specifiche date dalla casa di produzione del terreno stesso. In ogni caso può risultare utile utilizzare microrganismi di controllo (*Cladosporium cladosporioides*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*) per saggiare l'efficienza e la sterilità dei terreni adoperati.

Batteri e Funghi

La ricerca dei batteri e funghi saprofiti presenti nell'aria, come avviene nel caso delle analisi microbiologiche delle acque o di qualsiasi campione di natura ambientale, prevede l'utilizzo di terreni colturali che, permettendo la crescita ad una larga fascia di microrganismi, forniscono la stima degli eterotrofi vitali aereodispersi.

Microrganismi specifici, quali stafilococchi, attinomiceti, enterobatteri, *Pseudomonadaceae*, richiedono l'uso di metodiche e di terreni selettivamente adatti per la loro ricerca e successiva quantificazione e identificazione.

Per l'identificazione e classificazione dei funghi è comunque necessaria una specifica esperienza in materia per l'individuazione delle diverse morfologie così come dei corpi fruttiferi e degli elementi strutturali distintive di specie.

La ricerca di micotossine, che hanno una ben definita struttura molecolare e un comportamento noto nei sistemi di cromatografia, può essere effettuata con indagini biochimiche.

RICERCA DEGLI INDICATORI

Come trattato in precedenza la definizione della qualità dell'aria *indoor*, viene espletata attraverso la stima dei microrganismi eterotrofi contabili, coltivabili con

tempi e temperature di incubazione mirate a mettere in evidenza quei batteri o funghi di specifica natura ambientale (25°-30°C), o di più ristretta origine umana (30°-37°C).

Per quanto attiene la ricerca di microrganismi propriamente indicatori di uno stato preciso di contaminazione, come ad esempio la contaminazione fecale da controllare in ambienti confinati particolari, anche nella matrice aria possono essere ricercati quei microrganismi definiti indicatori classici di contaminazione fecale e già ampiamente utilizzati in campo analitico per matrici quali acqua, suolo, fanghi, sedimenti, come *Escherichia coli*, segnale indubbio di una contaminazione da coliformi fecali e, in casi più severi, *Salmonella* quale patogeno a derivazione fecale.

Per determinare il contributo antropico alla contaminazione del bioaerosol, gli indicatori possono essere rappresentati dal gruppo degli Stafilococchi, mentre per stimare la componente di batteri Gram-negativi vitali contabili può essere ricercato il parametro *Pseudomonas* spp.

In ambienti fortemente umidi, umidificati, climatizzati mediante termoconvettori a termostato o ventilati artificialmente, ove sia massiccia la presenza di vegetazione o di materiale tessile o cartaceo oltre ai funghi e ai batteri ambientali, possono essere ricercati anche gli attinomiceti che, potendo crescere a 15°-37°C, possono contribuire al giudizio complessivo della qualità dell'aria correlata allo stato igienico degli impianti di climatizzazione/ventilazione e al relativo stato/ricambio dei filtri, e dell'aria, negli ambienti *indoor*.

TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Qualora i campionamenti del bioaerosol vengono espletati mediante campionatori attivi equipaggiati di un mezzo liquido di raccolta, il campione deve essere processato mediante la semina di aliquote note con la tecnica dell'inclusione in agar.

Nel caso in cui vengono impiegate membrane filtranti (MF) in gelatina, come nel campionamento attivo per filtrazione una volta rimosse sterilmente dal mezzo di supporto, esse possono essere esaminate secondo due modalità:

- possono essere collocate sulla superficie di terreno di coltura solido e, direttamente incorporate nell'agar, permettono lo sviluppo e la conta delle colonie generate dai microrganismi vitali captati. Per evitare che la membrana di gelatina debordi o sgoccioli è necessario che la piastra non sia soggetta a bruschi movimenti e capovolgimenti durante l'incubazione.
- possono essere poste in beuta contenente terreno liquido, solitamente soluzione fisiologica (NaCl 8,5 g/l) o acqua peptonata (Bacteriological peptone 0,1%) dove, disciogliendosi completamente ad una temperatura di 30-35°C, rilasciano i microrganismi catturati. Questa operazione consente di allontanare eventuali sostanze tossiche o inibitrici accumulate dal filtro durante il prelievo. Il campione, in questo modo diluito, può essere esaminato anche con le stesse procedure analitiche utilizzate per le acque pertanto, l'analisi della sospensione ottenuta può essere effettuata con la tecnica delle membrane filtranti

(Membrane Filter Count), per la determinazione del titolo dei microrganismi in indagine.

La tecnica Membrane Filter Count, nella normale attività di un laboratorio di microbiologia, permette una semplificazione degli schemi operativi consentendo di trattenere, e di coltivare direttamente alla superficie del filtro, i batteri che sono contenuti nel campione liquido filtrato. A tal fine si utilizzano membrane filtranti in esteri di cellulosa, a porosità nominale di 0,45 µm e Ø 47 mm, impiegate allo scopo di saggiare uno stesso prelievo d'aria su terreni di coltura diversi per la ricerca contemporanea di microrganismi differenti. Se da una parte l'impiego del liquido può reidratare i microrganismi aereodispersi catturati, l'aggiuntivo procedimento di filtrazione sottopone ad ulteriore stress la flora microbica captata, potendo influire a ridurne la vitalità e, quindi, la possibilità di essere sub-coltivata e messa in evidenza.

SCelta DEI SUBSTRATI COLTURALI

Substrati colturali a formulazione completa da manipolare, preparare e allestire secondo le indicazioni della Ditta produttrice sono ampiamente disponibili in commercio per il recupero dei parametri microbiologici di interesse come:

- Eterotrofi vitali totali a 22°C e a 37°C
Per la ricerca di tale parametro possono essere utilizzati terreni colturali nutrizionali agarizzati, caratterizzati da differenti concentrazioni di sostanze nutritive e normalmente impiegati per l'isolamento, la crescita e il mantenimento dei microrganismi appartenenti a tale flora. Possono essere impiegati, quindi, terreni quali: Nutrient Agar o Plate Count Agar, substrati usati comunemente per le conte di microrganismi provenienti sia da ambienti oligotrofi che eutrofici come acque, liquami, feci e altri materiali. L'aria, tuttavia, è una matrice strettamente oligotrofa e pertanto può essere alternativamente utilizzato il terreno R2A (solitamente utilizzato per le acque trattate) che, caratterizzato da una bassa concentrazione di sostanze nutritive facilita il recupero di microrganismi stressati, danneggiati o adattati a tali condizioni. L'incubazione viene effettuata a 22°C per 72 ore ma può essere prolungata fino a (5÷7) giorni, per lo sviluppo dei batteri psicofili, e a 37°C per (48÷72) ore per la crescita delle colonie dei batteri mesofili.
- Carica fungina totale
I miceti possono essere quantificati mediante numerosi e diversificati terreni di isolamento a formulazione completa quali, per esempio, Sabouraud Dextrose Agar, Malt Extract Agar, Dichloran Rose Bengal Agar, Dichloran Glicerolo (DG18) o il substrato YPD Agar a formulazione parziale (a base di estratto di lievito, peptone e destrosio) ai quali può essere aggiunto cloramfenicolo come agente selettivo per inibire la crescita di batteri concomitanti. L'incubazione viene effettuata a (22÷25)°C per (3÷5) giorni, ma può essere prolungata fino ad una settimana, effettuando controlli

quotidiani dello stato delle piastre per verificare lo sviluppo di ceppi a crescita lenta che potrebbero venire occultati dal micelio aereo di muffe fortemente invasive.

- *Enterobacteriaceae*

Un ampio ed eterogeneo numero di bacilli Gram-negativi, il cui *habitat* naturale è costituito dall'intestino dell'uomo e di altri animali, è incluso in tale famiglia, impossibile da rilevare, quindi, con un unico substrato colturale. Gli enterobatteri sono accomunati da caratteristiche antigeniche e biochimiche tipiche dell'intero gruppo e resta difficile, pertanto, classificarli in base a queste caratteristiche in gruppi nettamente distinti; molti di essi presentano caratteri intermedi, tuttavia, ai fini della diagnostica medica una distinzione si rende necessaria.

L'enumerazione come gruppo indistinto viene effettuata sul Mac Conkey Agar che permette di differenziare i batteri coliformi lattosio fermentanti dagli enterobatteri patogeni che non fermentano il lattosio, come *Salmonella* e *Shigella*. I coliformi si presentano con colonie rosso-viola circondate da un alone di precipitazione, i coliformi non fermentanti il lattosio formano, invece, colonie incolori. Un altro substrato per la ricerca del presente parametro è il terreno Levine EMB Agar che consente di rilevare e differenziare vari microrganismi enterici inclusi i coliformi i quali, non presentando l'aspetto metallico, appaiono di colore grigio-marrone in luce trasmessa. Su questo terreno *Escherichia coli* forma tipiche colonie rosso scuro dal riflesso metallico mentre le colonie di batteri patogeni intestinali non fermentanti il lattosio risultano traslucide e incolori. L'incubazione viene effettuata a 37°C per 24 e 48 ore.

Un ulteriore substrato colturale impiegabile per la quantificazione dei coliformi fecali e la differenziazione di *E. coli* è il C-EC Agar che consente, in 18-24 ore, una determinazione quantitativa e contemporanea dei coliformi totali e di *Escherichia coli* con incubazione a 37°C, o la determinazione di *E. coli* e dei coliformi fecali con incubazione a 44°C. Composto da una base di agar, peptoni e sali biliari, addizionata di 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galattopiranoside (X-GAL), 4-metilumbelliferil- β -D-glucuronide (MUG), isopropil-tiogalattoside (IPTG) e triptofano, esso consente la crescita selettiva degli enterobatteri inibendo lo sviluppo di batteri Gram-positivi per la presenza di agenti selettivi. Tra gli enterobatteri, i coliformi possiedono l'enzima β -galattosidasi, idrolizzano il composto X-GAL e coltivano con colonie verde-blu. Tale reazione è resa maggiormente evidente dall'IPTG presente nel terreno. *Escherichia coli*, oltre ad idrolizzare il composto X-GAL, idrolizza anche il MUG e produce indolo da triptofano, sviluppando colonie di colore verde blu, fluorescenti alla lampada di Wood e positive al test dell'indolo. Tale test è eseguibile direttamente sulla piastra con una goccia di reattivo di Kovacs.

- *Staphylococcus* spp

Per la ricerca possono essere utilizzati il terreno Mannitol Salt Agar (MSA), molto selettivo per l'alto contenuto di sale, o il terreno Baird Parker Agar Base con aggiunta di emulsione di tuorlo d'uovo e tellurito di potassio. Nel primo substrato la fermentazione del mannitolo effettuata dagli stafilococchi è indicata dal viraggio evidenziabile sull'agar; nel secondo il contenuto di glicina e piruvato favoriscono lo sviluppo degli stafilococchi mentre il litio cloruro e il potassio tellurito inibiscono la crescita di flora contaminante.

Sul terreno Mannitol Salt Agar le colonie di colore giallo, comparse dopo incubazione a 37°C per 48 ore, sono da considerare come stafilococchi, mentre sul terreno Baird Parker Agar, dopo incubazione a 37°C per 48 ore, le colonie degli stafilococchi appaiono di colore nero per la riduzione del tellurito a tellurio. Su questo terreno è possibile evidenziare *Staphylococcus aureus* che forma colonie di colore nero circondate da un alone di chiarificazione.

- Attinomiceti

Per la ricerca di tale parametro può essere utilizzato il terreno nutritivo Actinomycetes Isolation Agar, che può essere reso selettivo per la crescita esclusiva degli attinomiceti a sfavore dei funghi mediante aggiunta di Cycloexmide 0,1% in soluzione acquosa sterile. Il terreno addizionato di glicerolo come fonte di carbonio è largamente impiegato per il recupero e la coltivazione di attinomiceti da matrici ambientali quali acqua e suolo. Questo substrato contiene sodio propionato per la fermentazione anaerobica e sodio caseinato e asparagina come fonte di azoto. Inoltre, la presenza di elementi quali magnesio e ferro solfati forniscono solfuri e ioni metallici. La specie patogena *N. asteroides* si presenta con micelio rosa o rosso che copre il substrato con ife aeree bianche.

Lo sviluppo delle colonie di attinomiceti può avvenire già alla temperatura di 20-25°C, tuttavia un migliore recupero di colonie tipiche si ottiene dopo incubazione in termostato a 28°C, per 48-72 ore, da protrarre fino a 14 giorni per il completo sviluppo delle spore.

- Enterococchi/Streptococchi

La quantificazione di questo parametro viene effettuata mediante i substrati Slanetz e Bartley Agar o Aesculin Bile Azide Agar, comunemente impiegati per il rilevamento degli enterococchi in acque, liquami e feci, con la tecnica delle membrane filtranti. Con entrambi i substrati gli enterococchi formano colonie di colore rosa o rosse con diametro intorno a 3 mm, dopo incubazione a 37°C in termostato per 48 ore.

Per confermare che le colonie cresciute siano Enterococchi viene utilizzato il terreno Esculin Iron Agar, sul quale vanno seminate le colonie isolate o vanno adagiate, qualora siano state impiegate, le membrane filtranti. Dopo

incubate a 44°C per 20 minuti gli enterococchi formeranno alone nero sul substrato per precipitazione del ferro.

- *Pseudomonas* spp

Per la ricerca vengono usati i substrati *Pseudomonas* Agar Base o il terreno Cetrimide Agar. Entrambi prevedono l'aggiunta di glicerolo come fonte di energia e per promuovere la produzione di piocianina, tipico pigmento blu-verde che diffondendo nel terreno circostante alle zone di crescita individua le colonie di *Pseudomonas*. Affinché l'azione di recupero delle *Pseudomonadaceae* sia più specifica, il primo substrato nutritivo prevede l'aggiunta del supplemento contenente cetrimide, fucidina e cefaloridina (CFC) che inibisce la crescita dei Gram-positivi e degli altri microrganismi Gram-negativi. Le colonie di *P. aeruginosa* possono invece essere evidenziate aggiungendo unicamente il supplemento specifico contenente cetrimide e acido nalidissico (CN-*Pseudomonas*-Supplement). Per la quantificazione delle *Pseudomonadaceae* l'incubazione viene effettuata a 37°C per 24 e 48 ore e a 44°C per 24 e 48 ore per lo sviluppo delle colonie di *P. aeruginosa*.

Su entrambi i terreni le colonie che emettono fluorescenza eccitate alla luce di Wood a lunghezza d'onda 366 nm appartengono a ceppi fluorescenti; la presenza di colonie di colore blu-verde fluorescenti già a 254 nm sono da considerare come *P. aeruginosa*.

RICERCA DI BATTERI PATOGENI

Data la particolarità della matrice aria, si può supporre che tutti i microrganismi *aiborne* siano potenzialmente danneggiati proprio per il "passaggio di stato" che hanno subito (Kingstone, 1971). La ricerca dei patogeni, e opportunisti tali, negli aerosol si presenta per questa ragione più ardua rispetto alla ricerca di altri organismi più genericamente "ambientali". Il rilevamento di patogeni, già normalmente presenti in concentrazioni inferiori rispetto a quelle dei comuni eterotrofi, risulta ancor più difficile negli aerosol dove le condizioni ostili proprie dell'ambiente, la scarsità o assenza di nutrienti, ne diminuiscono la vitalità e quindi l'evidenziazione.

In ogni caso è di interesse sanitario allargare il campo delle indagini in questa direzione includendo la possibilità di verificare la presenza delle salmonelle qualora la tipologia di ambiente, per essere caratterizzato, rende necessaria la ricerca di tale patogeno enterico, in considerazione anche del fatto che attualmente *Salmonella* spp viene considerato un microrganismo "riemergente" grazie a nuovi sierotipi dotati di notevole patogenicità e diffusibilità, anche per la resistenza acquisita agli antibiotici (Elena Piccoli, 2008:

http://www.lambda.it/index.php?option=com_content&view=article&id=71:salmonella-spp&catid=56:batteri&Itemid=61).

SALMONELLA spp

La procedura analitica per il rilevamento di *Salmonella* consiste in tre fasi successive che comprendono: prearricchimento, arricchimento e isolamento a cui può seguire una conferma biochimica e/o sierologica delle colonie isolate.

Essendo un microrganismo estremamente vulnerabile, la procedura di campionamento deve essere espletata mediante campionatori attivi equipaggiati di mezzo liquido (gorgogliatori) o, ancor meglio, mediante campionatori filtranti su membrane di gelatina (MF), captando volumi di aria da un minimo di 1000 L a volumi maggiori che consentono la possibilità di un'indubbia quantificazione.

- **Prearricchimento**

La fase di prearricchimento prevede l'inoculo, in doppio, del campione da analizzare in acqua peptonata tamponata, preparata al doppio della concentrazione, qualora il campione provenga da diverso liquido di raccolta che va inoculato in egual volume, o l'inserimento nel terreno della membrana di gelatina, incubando a 37°C per 24 ore. Questa prima fase è essenzialmente una fase di rivitalizzazione in un brodo non selettivo, in cui intervengono meccanismi di riparazione biochimica, che permettono ai microrganismi, stressati da aerosolizzazione e filtrazione ma forse ancora vitali, di moltiplicarsi e successivamente di svilupparsi sui substrati selettivi.

- **Arricchimento**

Questa fase prevede che un'aliquota prelevata dal brodo di arricchimento, venga inoculata nel brodo selettivo Rappaport Vassiliadis, secondo la tecnica del Numero più Probabile dei tubi multipli (MPN) con incubazione per 24 ore a 42°C; la temperatura e le sostanze selettive contenute nel terreno inibiscono la crescita degli altri microrganismi favorendo quella di *Salmonella* spp.

- **Isolamento**

La fase di isolamento consiste nel prelevare un'aliquota dal brodo di arricchimento e subcolturarla su un terreno selettivo agarizzato. Per l'isolamento possono essere utilizzati in alternativa Hektoen Enteric Agar, Rambach Agar o Xilosio-Lisina-Desossicolato Agar. Dopo incubazione a 37°C per 24 ore, i terreni vengono esaminati per verificare la comparsa di colonie tipiche; pertanto l'Hektoen Enteric Agar fornirà colonie di *Salmonella* spp di colore verde-blu o blu, con caratteristico centro nero e viraggio del terreno al blu; sul Rambach Agar le colonie si presentano di colore rosa, mentre sul terreno Xilosio-Lisina-Desossicolato Agar il colore tipico è il rosso rosato con centro nero ad eccezione dei ceppi H₂S negativi.

Per la conferma delle colonie sospette *Salmonella*, isolate dal terreno selettivo, sono richieste prove biochimiche successivamente alle quali si potrà procedere con ulteriori prove di identificazione mediante sistemi

biochimici miniaturizzati, quali gallerie API 20E, o sistemi automatizzati quali VITEK utilizzando le apposite card di identificazione GNI+.

Virus

Alla raccolta del campione (aria o superfici) segue l'identificazione dell'agente virale.

La metodica più significativa a livello diagnostico è l'isolamento dei virus su opportune colture cellulari sensibili e permissive, sulle quali i virus possono moltiplicarsi. La presenza di virus in una coltura cellulare è la dimostrazione della sua capacità infettante, ossia della capacità di penetrare e replicarsi in un certo tessuto. Può rendersi manifesta nella comparsa di alterazioni cellulari (effetto citopatico) che si esprimono morfologicamente in fenomeni diversi (perdita della forma, ingrossamento, formazione di inclusioni cellulari e/o citoplasmatiche, fenomeni di necrosi, degenerativi e formazione di sincizi). Diverse problematiche sono associate alle colture cellulari per l'identificazione dei virus. Innanzitutto non esistono sistemi adattabili a tutti i virus: alcuni virus possono moltiplicarsi su diverse linee cellulari, mentre altri presentano una specificità cellulare più stretta. Esistono inoltre gruppi virali (es. norovirus) che non sono in grado di moltiplicarsi in alcuna delle linee cellulari attualmente utilizzate. La sensibilità della metodica è un altro problema non trascurabile, dal momento che frequentemente i virus sono presenti nelle matrici ambientali in basse concentrazioni. Infine l'utilizzo di metodiche cellulari necessita di tempi lunghi, variabili da 1 a 4 settimane. Gli studi effettuati in ambienti *indoor* per l'identificazione di virus mediante utilizzo di colture cellulari sono piuttosto limitati e riguardano enterovirus, adenovirus, virus parainfluenzali, virus influenzali (12; 63).

Negli ultimi anni le tecniche molecolari, basate sulla ricerca di sequenze del genoma virale, sono state utilizzate con sempre maggiore frequenza per l'identificazione di virus in ambienti *indoor*. La diagnostica molecolare si rivela in genere, più sensibile e/o più specifica dei metodi culturali tradizionali. Molte delle tecniche correntemente usate si basano sull'amplificazione mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) degli acidi nucleici, sia di frammenti di DNA che di RNA (dopo trascrizione in cDNA attraverso l'uso di una trascrittasi inversa). Dopo l'amplificazione, la conferma della presenza del virus target può essere effettuata mediante analisi della dimensione dei frammenti amplificati, sequenziamento dei frammenti di DNA, ibridizzazione con sonde marcate. La Real-Time PCR rappresenta una evoluzione della PCR classica; la tecnica consente la simultanea amplificazione e quantificazione del DNA target. I metodi di diagnostica molecolare, a fronte di innegabili vantaggi, presentano tuttavia alcuni punti critici: richiedono competenze tecniche specialistiche, sono più costosi per quanto riguarda la strumentazione, e, soprattutto, non sono in grado di dare informazioni sulla vitalità del patogeno, in quanto basati sulla presenza di DNA/RNA. Negli ultimi anni sono stati sviluppati ed utilizzati con successo sistemi integrati colture cellulari/metodi molecolari che combinano i vantaggi di entrambe le metodiche.

Virus a trasmissione aerea che sono stati identificati in ambienti *indoor* con metodi molecolari di PCR o Real-Time PCR includono l'influenza (12;63;64), il rhinovirus (13), il virus respiratorio sinciziale (7;31), il virus varicella-zoster (54), e virus della SARS (22).

Allergeni

Estrazione

La procedura di estrazione degli allergeni dai campioni di polvere, prevede in primo luogo che il campione di polvere venga setacciato mediante un setaccio a mesh 45, la polvere fine così ottenuta andrà pesata, in modo da poter stabilire il volume di tampone da utilizzare per il quantitativo di polvere in questione. La metodica attualmente più utilizzata prevede l'estrazione dei campioni con il seguente rapporto: 100 mg di polvere fine (dopo setacciatura) in 2 ml di PBS Tween 0,05%. Dopo aver aggiunto il volume di tampone nel rapporto appropriato è necessario agitare il tubo contenente il campione e il tampone di estrazione tramite un vortex, dopodiché tale tubo verrà posto su un agitatore e fatto oscillare per due ore a temperatura ambiente. Tutte le operazioni devono essere eseguite con molta cautela e l'oscillazione deve essere impostata alla minima potenza dello strumento in modo da non creare schiuma nel campione a causa della presenza del Tween. Successivamente il tubo andrà centrifugato e il soprannatante dovrà essere rimosso con una pipetta, ripartito in aliquote e conservato a -20°C fino all'analisi. Anche in questo caso, in tutte le fasi di estrazione, è importante attenersi scrupolosamente alle temperature di conservazione dei campioni sopra riportate, per non alterare il contenuto degli allergeni nel campione, essendo delle molecole di origine biologica. Come già accennato in precedenza, la concentrazione di allergeni misurata utilizzando la metodica di campionamento da superficie si esprime in termini di µg di allergene per grammo di polvere (µg/g) oppure µg di allergene/m² di superficie campionata per minuto in base al protocollo di campionamento applicato.

Dosaggi degli allergeni nei campioni di polveri dopo estrazione

Successivamente alla fase di estrazione si esegue il dosaggio degli allergeni. Insieme alla procedura di campionamento, l'analisi degli allergeni è uno degli aspetti più critici di tutto il processo. Il metodo ad oggi maggiormente utilizzato e più idoneo per effettuare la determinazione quantitativa degli allergeni specifici all'interno degli estratti di polvere prevede l'utilizzo del saggio ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Se si vuole mettere a punto e convalidare tale metodica *in house*, il materiale di partenza necessario è rappresentato da uno standard, generalmente rappresentato dall'allergene di interesse purificato oppure ottenuto mediante clonaggio ed espressione in sistemi procariotici o eucariotici, dagli anticorpi monoclonali o policlonali specifici per l'allergene in esame e, infine, dagli estratti di polvere. Tutti gli

altri reagenti necessari (anticorpo secondario, tamponi per i lavaggi, substrato-cromogeno) sono disponibili in commercio.

Più comunemente, la metodica generalmente utilizzata viene chiamata "ELISA sandwich", poiché si avvale dell'uso di due anticorpi, il primo che serve per catturare l'allergene presente nel materiale ottenuto dal processore estrazione dei campioni e il secondo che ha la funzione di riconoscere l'allergene catturato dal primo anticorpo e di fare poi da "ponte" con un anticorpo secondario opportunamente marcato o con un sistema in grado di amplificare ulteriormente il segnale (del tipo biotina-avidina) o direttamente con un enzima quale la perossidasi. Il principio di tale metodo prevede che i pozzetti di una piastra ELISA vengano rivestiti con l'anticorpo monoclonale specifico per l'antigene che deve essere misurato, in una fase denominata di "*coating*" che prevede l'incubazione della piastra per tutta la notte a +4°C. Il giorno seguente, dopo aver eseguito una fase di lavaggio costituita da tre lavaggi, la piastra viene poi nuovamente incubata con una soluzione di albumina da siero bovino oppure con altra soluzione contenente molecole che hanno la funzione di saturare le porzioni di plastica sulle quali non si sono legati gli anticorpi monoclonali primari durante la fase di *coating*. Questo passaggio serve ad impedire che gli antigeni che verranno poi aggiunti nel corso delle fasi successive possano andare a legarsi in modo aspecifico alla plastica dei pozzetti fornendo risultati non veri. Dopo una ulteriore fase di lavaggio in ciascun pozzetto viene introdotto l'antigene (allergene) contenuto negli estratti di campioni di polvere. Tale antigene, se presente negli estratti, si lega all'anticorpo specifico adsorbito. All'interno dei campioni di polvere possono essere presenti contemporaneamente tutti gli allergeni (ad es. Fel d 1, Can f 1, Der p 1, Der f 1 ecc.). Ovviamente il legame di ciascun antigene sarà determinato dalla specificità dell'anticorpo adsorbito sulla piastra. Tutti gli altri antigeni verranno eliminati con la successiva fase di lavaggio. Infatti, dopo opportuna incubazione, i lavaggi effettuati hanno la funzione di eliminare gli antigeni in eccesso e/o non specifici. A questo punto viene introdotto un secondo anticorpo, monoclonale o policlonale, anch'esso specifico per l'antigene in esame, ma per un epitopo diverso da quello riconosciuto dall'anticorpo con cui è stato effettuato il *coating*. Tale anticorpo in genere è biotinilato, ed è seguito, nel passo successivo, dalla aggiunta di perossidasi coniugata con avidina o streptavidina; nel caso in cui questo secondo anticorpo fosse invece non biotinilato, il passo successivo prevede l'aggiunta di un anticorpo direttamente coniugato con un enzima specifico (perossidasi o fosfatasi) che si legherà alla porzione Fc del secondo anticorpo. La reattività dei singoli pozzetti dell'intero sistema (costituito da anticorpo specifico con cui è stato effettuato il *coating*, dall'allergene, dal secondo anticorpo biotinilato oppure, eventualmente, da un anticorpo secondario direttamente coniugato con enzima), viene quindi visualizzata con un substrato-cromogeno idoneo in funzione dell'enzima utilizzato. Uno standard di riferimento appropriato, e a concentrazione nota, è fondamentale per ottenere una curva standard sulla quale interpolare le densità ottiche ottenute con i campioni di estratti di polvere saggiati, in modo da poter risalire alla loro concentrazione. Attualmente sono disponibili in

commercio una serie di sistemi ELISA, sotto forma di kit per rilevare e quantificare la presenza di allergeni indoor mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali specifici per i singoli allergeni. Per quanto riguarda gli acari della polvere (House Dust Mite) sono disponibili saggi ELISA per rilevare la presenza dei seguenti allergeni: Der p 1, Der f 1, Der f 2, Mite Group 2 (che riconosce gli allergeni di gruppo 2 sia del *Dermatophagoides pteronyssinus* sia del *Dermatophagoides farinae*) e Blo t 5. Per ciò che concerne gli allergeni derivati da animali ad oggi sono disponibili i saggi per Fel d 1 (gatto), Can f 1 (cane), Equ c 4 (cavallo), Bos d 2 (bovino), Rat n 1 (ratto), Mus m 1 (topo). Per rilevare la presenza di allergeni delle blatte sono disponibili i saggi per Bla g1 e Bla g2. Infine, per quantificare la presenza di muffe sono disponibili saggi per gli allergeni Asp f 1 ed Alt a 1 (i due allergeni maggiori di *Aspergillus fumigatus* e *Alternaria alternata*, rispettivamente) e AveX (antigene di *Aspergillus versicolor*), SchX (antigene di *Stilbospora chartarum*), SchY (antigene di *Stilbospora chartarum*). Quest'ultima specie è rappresentata da funghi tossici che crescono in ambienti molto umidi e sono stati associati ai casi di *sick building syndrome*.

Ovviamente è possibile anche produrre reagenti in maniera autonoma, purificarli ed utilizzarli per dosare gli allergeni menzionati. In ogni caso, indipendentemente dalla natura dei reagenti e dalla loro provenienza, come accennato all'inizio di questo paragrafo, un aspetto cruciale è rappresentato non solo dalla messa a punto, ma anche dalla convalida del metodo ELISA quantitativo in base a quanto richiesto dalla linea guida ICH Q2 (R1) "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology". Ovviamente anche nel caso di un metodo che sia già stato convalidato, ad es. da un altro Laboratorio o da una Ditta che lo mette in commercio, per essere in grado di fornire risultati attendibili, il Laboratorio che utilizza il metodo è tenuto ad effettuare una ulteriore convalida, se pur ridotta, che dimostri che il metodo, nel proprio Laboratorio e con il personale utilizzato, sia idoneo all'uso. Tale aspetto è fondamentale per fornire un reale supporto alla comunità scientifica e alle Autorità Regolatorie fornendo dati riproducibili e il più possibile veri, al fine di stabilire quali sono gli aspetti da implementare di volta in volta per migliorare la qualità dell'aria e quindi la salute dei cittadini dal punto di vista della presenza di allergeni negli ambienti indoor. Nell'ottica di fornire dati attendibili, inoltre, è di estrema importanza inserire nei singoli dosaggi ELISA sempre uno o due campioni di riferimento come controllo positivo e uno o due campioni come controllo negativo. I dati dei controlli devono ovviamente essere riproducibili e la curva standard deve essere sempre all'interno dei parametri stabiliti nella fase di convalida del metodo. E' inoltre opportuno effettuare per ciascun campione da dosare almeno quattro o cinque diluizioni al raddoppio (ciascuna diluizione ripetuta in doppio o in triplicato). In questo modo si ha la possibilità di avere almeno tre punti che possono essere interpolati nella porzione lineare della curva standard (che solitamente è una sigmoide), fornendo dopo adeguati calcoli statistici la concentrazione dell'allergene del campione. Pertanto i valori ottenuti, corretti dal sistema di calcolo per il fattore di diluizione, e basati sui risultati sperimentali ottenuti almeno per i tre punti di diluizione, saranno affidabili e coerenti

con i concetti moderni di convalida di un metodo analitico. . Mediante il sistema ELISA, ad oggi unico saggio immuno-chimico in grado di fornire risultati quantitativi attendibili in tale ambito, è possibile ottenere dati con errori all'interno di un "range" accettabile per un sistema basato su un dosaggio immunobiologico.

Ovviamente il procedimento di messa a punto di un metodo ELISA per il dosaggio di un nuovo allergene (o la messa a punto di un ELISA che non utilizzi reagenti commerciali) prevede la caratterizzazione del nuovo allergene nell'estratto ottenuto dalla specifica fonte, la sua produzione in sistemi ricombinanti oppure la sua purificazione dall'estratto stesso, la sua caratterizzazione per valutare se l'allergene può essere adatto all'utilizzo come un eventuale standard. Inoltre, devono essere prodotti gli anticorpi, possibilmente monoclonali, specifici per due epitopi differenti presenti sullo stesso allergene. Infine, se tutti i dati preliminari di caratterizzazione dimostrano che i reagenti ottenuti sono adatti allo scopo, si può procedere alla messa a punto, standardizzazione e convalida del metodo. Pertanto, dalla mole di lavoro che necessariamente è a monte dello sviluppo e della convalida del metodo, nonché per l'applicazione del metodo stesso, è intuibile comprendere la ragione per cui ad oggi esistono ancora pochi metodi convalidati per gli allergeni indoor e perché spesso in letteratura sono pubblicati dati discordanti e, talvolta, poco chiari che ad oggi rendono ancora difficile stabilire con certezza aspetti importanti quali, ad esempio, le soglie di rischio per l'esposizione agli allergeni e giustifica anche il perché gli ultimi e sostanzialmente unici valori ipotizzati sulle soglie di rischio risalgano al 1997 (Platts-Mills TA et al.) e siano disponibili solo per pochi allergeni.

Endotossine batteriche

Estrazione

Relativamente alla determinazione di questo parametro è necessaria una importante premessa: le endotossine sono dei pirogeni endogeni e pertanto, al fine di non alterare il dato relativo alla reale concentrazione di endotossina presente nel campione, ogni materiale impiegato per l'analisi deve essere imperativamente apirogeno. La depirogenazione (rimozione o distruzione dei pirogeni e loro endotossine) avviene mediante distruzione termica in stufa a calore secco a 180 °C per 3 – 4h.

Per questo trattamento deve essere utilizzata una stufa qualificata, ovvero deve essere dimostrabile che sia la temperatura che il tempo di trattamento termico sono stati sufficienti per abbattere la concentrazione di endotossine di almeno 3 log.

Per l'estrazione delle endotossine dai filtri utilizzati nel campionamento di ambienti *indoor* non esiste un metodo standard, possono essere impiegati acqua apirogena o soluzioni tampone (ad esempio TRIS), con o senza l'aggiunta di un disperdente come Tween 20, Tween 80, Triton X-100 o saponina. Il volume del liquido di estrazione dipenderà dalle dimensioni del filtro: dovranno essere impiegati non meno di 5 ml se il filtro ha un diametro ≤ 50 mm e non meno di 10 ml se il filtro ha un diametro ≥ 50 mm.

Alcuni studi hanno comunque dimostrato che l'aggiunta di Tween 20 allo 0,05% al mezzo estraente aumenta sostanzialmente l'efficienza di estrazione dell'endotossina (Douwes et al.,1995; Noss et al., 2010a; Spaan et al., 2007, 2008a).

Dopo l'estrazione dovrà essere misurato il pH, il cui valore dovrà essere compatibile con le *performance* del saggio analitico di determinazione *Limulus Amebocyte Lisate* test (LAL). L'impiego di soluzioni tampone o detergenti può favorire la determinazione delle endotossine con il saggio LAL nei casi in cui l'estratto presenti valori di pH diversi da quello ottimale–richiesto dal test stesso o quando, nello stesso test, si ha un aumento della forza ionica.

L'estrazione può essere effettuata mediante agitazione vigorosa e/o sonicazione; l'agitazione per 1 ora a temperatura ambiente ha mostrato la produzione estrattiva massima di endotossina (UNI EN 14031:2005).

Al termine dell'estrazione i campioni dovranno essere centrifugati a 1000 g per 15 minuti. Il soprannatante degli estratti potrà essere processato direttamente per l'analisi o potrà essere congelato a -20°C, stoccato in provette apirogene in numerose aliquote multiple, da destinarsi a successiva determinazione quantitativa delle endotossine mediante LAL test. Data la stabilità delle endotossine al congelamento, gli estratti possono essere conservati a tali condizioni anche per lunghi periodi di tempo. Lo stoccaggio in aliquote multiple si ritiene necessario e indispensabile al fine di evitare che cicli di congelamento-scongelo possano diminuire la concentrazione di endotossina anche del 25%.

Allo scopo di evitare contaminazioni interne è necessario che tutto il materiale di consumo utilizzato sia esente da endotossine poiché, eventuali tracce adsorbite o rilasciate in provette o pipette, andrebbero naturalmente ad interferire con l'esito delle analisi. La vetreria impiegata, infatti, deve essere rigorosamente in vetro borosilicato poiché quella in sodio silicato è in grado di adsorbire le endotossine impedendone la corretta quantificazione, interferendo quindi, in modo negativo, nella riuscita delle determinazioni (Novitsky TJ, et al., 1986).

Determinazione

La determinazione della concentrazione delle endotossine viene effettuata mediante il *Limulus Amebocyte Lisate* test (LAL) che utilizza il lisato di cellule del sangue, amebociti, del *Limulus polyphemus* per determinare e quantificare la presenza di endotossine; gli amebociti, attivano, quindi, una reazione enzimatica a catena che determina una coagulazione locale del sangue.

La metodica del LAL test è accreditata dalla Farmacopea per la ricerca di endotossine nelle soluzioni fisiologiche, nei farmaci e nelle soluzioni da dialisi (Pharmacopée Européenne. Quatrième Edition. Serie des trites europeens n°50. Conseil de l'Europe, Strasburgo, 147-155)

e adattata solo successivamente per la valutazione della concentrazione di endotossine in altre matrici, anche ambientali. (Guideline on validation of the *Limulus*

Amebocyte Lisate Test as an end product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products and medical devices. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, December 1987).

Dalla specie *Limulus polyphemus* viene prelevata l'emolinfa mediante una puntura intracardica che una volta effettuata permette il rilascio immediato dell'animale in mare.

Il *Limulus* appartiene alla classe degli *Xiphosura*, artropodi chelicerati il cui sistema immunitario per quanto semplice e primitivo e in grado di riconoscere efficacemente il polisaccaride dei batteri gram-negativi.

Sono anche denominati "granchi a ferro di cavallo", già esistenti nell'era Paleozoica. Il "sangue" è formato da un solo tipo di cellula amebocita di colore blu in quanto contiene emocianina ($\text{Cu}^{++} \leftrightarrow \text{Cu}^+$). Dagli amebociti si ottiene un estratto acquoso che reagisce specificatamente con i lipopolisaccaridi, o endotossine, che costituiscono parti importanti della parete cellulare dei batteri Gram-negativi.

Fenomeni di inibizione e/o attivazione da parte di peptidoglicani, altri componenti della parete batterica, e degli s-glicani di origine fungina che possono, tuttavia, interferire con la reazione enzimatica del LAL.

La reazione tra il lisato di amebociti e le endotossine batteriche è alla base delle tre differenti metodiche LAL test disponibili: gel-clot, cromogenico e turbidimetrico.

Tali metodi differiscono nel tipo di risultato finale e nel valore di endotossina rilevabile: il gel clot in presenza di endotossine nel campione sviluppa un coagulo compatto, il cromogenico emette colore, mentre il turbidimetrico sviluppa torbidità. La concentrazione di endotossina misurata viene sempre espressa come EU/ml (Unità di Endotossine per millilitro) e deve essere sempre rapportata ai volumi di aria campionata.

In ogni serie di campioni esaminati dovrebbe essere incluso sia un controllo negativo che positivo.

Il controllo negativo è costituito da acqua per LAL apirogena sterile.

Il controllo positivo è costituito da Endotossina Standard di Riferimento (RSE). La RSE ha avuto inizialmente diverse denominazioni a seconda dei vari Enti di riferimento (USA, Europa e WHO), ma dal gennaio 1998 le RSE dei tre Enti sono la stessa cosa, in quanto uniformate ad *E. coli* EC-6

- Il gel clot è un metodo qualitativo o semi-quantitativo in cui viene sfruttata la caratteristica del lisato delle cellule del sangue del *Limulus* di formare, in presenza di endotossine, un coagulo compatto sul fondo di una provetta. Mentre la reazione completa non è ancora chiara, è stata ben descritta l'ultima fase: la proteina coagulabile (coagulogeno) è scissa mediante un enzima coagulante attivato e i prodotti insolubili della scissione si uniscono per interazione ionica formando il gel (Bacterial endotoxins test. 1696, 85. United States Pharmacopeia, 23rd Revision 1995. U.S. Pharmacopeial Convention, Inc-Rockville, MD).

La lettura dei risultati, dopo 60 minuti di incubazione in un termostato a secco a 37°C, si esegue semplicemente capovolgendo la provetta di 180° e osservando la presenza, o meno, di coagulo compatto e aderente al fondo.

Il calcolo dell'intervallo di concentrazione si ottiene mediante la valutazione della concentrazione corrispondente all'ultima diluizione con risultato positivo e la prima diluizione con esito negativo. considerando il volume finale del campione, la sensibilità massima del kit utilizzato e il volume di aria captato. Il risultato finale è stato espresso come Unità di Endotossina per metro cubo di aria (EU/m³).

Sono disponibili in commercio quattro diversi tipi di lisato che si differenziano per la massima sensibilità di determinazione di endotossina: 0,25 EU/ml, 0,125 EU/ml, 0,06 EU/ml e 0,03 EU/ml. La concentrazione delle endotossine nel campione può essere rilevata qualora sia pari o superiore alla sensibilità del lisato impiegato.

- Il cromogenico è un metodo di analisi quantitativo cinetico o *end-point* in cui il lisato degli amebociti, in presenza di endotossine, emette colore nella soluzione in esame; la concentrazione di endotossina viene determinata in funzione dell'aumento dell'emissione di un cromoforo giallo e quindi della densità ottica del preparato; maggiore è la concentrazione di endotossina nel campione, più velocemente viene emesso il colore che viene misurato come valore di densità ottica (OD) mediante lo specifico lettore per micropiastre ELX 808I con software dedicato e possibilità d'incubazione ad una temperatura di 37°C. I valori di endotossina nei campioni vengono calcolati sulla curva standard costruita con diverse concentrazioni note dell' endotossina Standard di Riferimento internazionale (RSE). Con tale metodo è possibile determinare concentrazioni di endotossina fino a 0,005 EU/ml.
- Il turbidimetrico è un metodo di analisi quantitativo cinetico in cui il lisato sviluppa torbidità in presenza di endotossine; maggiore è la concentrazione di endotossina nel campione, più velocemente si sviluppa la torbidità che viene letta come valore di densità ottica (OD). Con il metodo cinetico-turbidimetrico viene determinato sia l'incremento quantitativo della torbidità, sia il tempo impiegato dalla reazione per raggiungere un particolare livello di torbidità (tempo limite o valore soglia). Il test richiede l'impiego di una specifica apparecchiatura, PyrosKinetix con software dedicato, per incubare i campioni ad una temperatura controllata di 37°C e per leggere i valori di OD ad intervalli regolari. I valori di endotossina nei campioni vengono calcolati sulla curva standard costruita con differenti concentrazioni note dell' endotossina Standard di Riferimento internazionale (RSE). L'analisi turbidimetrica è molto rapida, semplice e soprattutto molto sensibile: è infatti possibile rilevare valori di endotossina fino a 0,001 EU/ml.

È universalmente stabilito che 10,0 EU corrispondono a 1,0 ng di endotossina, tuttavia l'attività di una endotossina determinata con un dato lotto di reagente LAL (lisato) può differire quando viene determinata con un lotto diverso. Le Unità di Endotossina sono la misura dell'attività dell'endotossina stessa e le endotossine differiscono nella loro attività biologica. La pirogenicità, o reattività al LAL test, di una preparazione endotossinica può essere molto diversa da quella di un'altra preparazione dello stesso peso. Viceversa, due molecole endotossiniche possono differire in dimensioni e peso, ma possono avere identica reattività al LAL test. Esprimendole concentrazioni di endotossina in EU si evitano, quindi, possibili incomprensioni causate dalle diverse attività delle differenti endotossine e si ha la possibilità di paragonare i risultati di diversi LAL test effettuati anche in laboratori diversi. E' consigliabile, pertanto, non convertire i risultati di un LAL test espresso in EU/ml, in unità di peso di endotossina per ml.

Inoltre, al fine di garantire risultati attendibili e di individuare eventuali interferenze da parte dei campioni nei confronti del LAL test, tutte le metodiche descritte prevedono l'effettuazione di una routinaria prova di attivazione/inibizione sul campione, alla massima diluizione valida (Pharmacopée Européenne. Quatrième Edition. Serie des trites europeens n° 50. Conseil de l'Europe, Strasburgo, 147-155).

Tale prova prevede l'aggiunta di uno standard di endotossina di *Escherichia coli* (CSE) a diluizioni del campione, in modo da avere le concentrazioni di 2λ , λ , $1/2\lambda$, $1/4\lambda$, dove λ rappresenta la sensibilità del lisato considerato, che viene normalmente ottenuto diluendo l'endotossina standard con il campione fino alle concentrazioni richieste. Esse vengono saggiate in quadruplo parallelamente alle concentrazioni di CSE effettuate in acqua apirogena che vengono testate in doppio.

Il test comprende anche il suo controllo negativo (acqua apirogena) da effettuare in doppio, e il controllo negativo del campione stesso (ossia il campione senza aggiunta di endotossina CSE) da saggiare in quadruplo.

In questo modo dal risultato del LAL test ottenuto dal campione addizionato di CSE è possibile determinare l'eventuale presenza di interferenze negative (inibizione), mentre dal campione senza endotossina è possibile rilevare la presenza di falsi positivi. Se entrambe le condizioni (attivazione/inibizione) risultano entro un fattore due dal limite di sensibilità, si considerano assenti gli effetti di inibizione o di attivazione da parte del campione sulle *performance* del LAL test.