



Rapporti ISTISAN

13/37



Strategie di monitoraggio
dell'inquinamento di origine biologica
dell'aria in ambiente *indoor*



ISSN 1123-3117

L. Bonadonna, R. Briancesco,
B. Brunetto, A.M. Coccia,
V. De Gironimo, S. Della Libera,
S. Fuselli, P.M.B. Gucci, P. Iacovacci,
I. Lacchetti, G. La Rosa, P. Meloni,
R. Paradiso, C. Pini e M. Semproni
per il Gruppo di Studio Nazionale
sull'Inquinamento *Indoor*

www.iss.it

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Strategie di monitoraggio
dell'inquinamento di origine biologica
dell'aria in ambiente *indoor***

Lucia Bonadonna (a), Rossella Briancesco (a),
Barbara Brunetto (b), Anna Maria Coccia (a),
Vincenzo De Gironimo (c), Simonetta Della Libera (a),
Sergio Fuselli (a), Paola Margherita Bianca Gucci (a), Patrizia Iacovacci (b),
Ines Lacchetti (a), Giuseppina La Rosa (a), Pierluigi Meloni (a),
Rosa Paradiso (a), Carlo Pini (b), Maurizio Semproni (a)
per il Gruppo di Studio Nazionale sull'Inquinamento *Indoor*

*(a) Dipartimento di Ambiente e connessa Prevenzione Primaria,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(b) Centro per la Ricerca e la Valutazione dei Prodotti Immunobiologici,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

13/37

Istituto Superiore di Sanità

Strategie di monitoraggio dell'inquinamento di origine biologica dell'aria in ambiente indoor.

Lucia Bonadonna, Rossella Briancesco, Barbara Brunetto, Anna Maria Coccia, Vincenzo De Gironimo, Simonetta Della Libera, Sergio Fuselli, Paola Margherita Bianca Gucci, Patrizia Iacovacci, Ines Lacchetti, Giuseppina La Rosa, Pierluigi Meloni, Rosa Paradiso, Carlo Pini, Maurizio Semproni per il Gruppo di Studio Nazionale sull'Inquinamento Indoor

2013, vi, 72 p. Rapporti ISTISAN 13/37

Questo documento ha l'obiettivo di uniformare metodologie che potranno consentire di caratterizzare e valutare le concentrazioni di agenti biologici (allergeni, batteri, endotossine, funghi, ecc.) in ambienti confinati. Le indicazioni sono rivolte in particolare a quelle strutture che, a vario titolo, sono preposte al controllo e/o allo studio microbiologico della qualità dell'aria e delle superfici negli ambienti indoor.

Parole chiave: Allergeni; Ambienti indoor; Analisi microbiologica; Aria; Batteri; Funghi; Superfici; Tecniche di campionamento.

Istituto Superiore di Sanità

Monitoring strategies of biological air pollution in indoor environment.

Lucia Bonadonna, Rossella Briancesco, Barbara Brunetto, Anna Maria Coccia, Vincenzo De Gironimo, Simonetta Della Libera, Sergio Fuselli, Paola Margherita Bianca Gucci, Patrizia Iacovacci, Ines Lacchetti, Giuseppina La Rosa, Pierluigi Meloni, Rosa Paradiso, Carlo Pini, Maurizio Semproni on behalf of the Indoor Pollution Working Group 2013, vi, 72 p. Rapporti ISTISAN 13/37 (in Italian)

This volume aims to uniform methodologies which can help to characterize biological agents such as allergens, bacteria, endotoxins, moulds, etc. indoor. Information are particularly addressed to those institutions appointed to microbiological controls and/or study of air and surface indoor with the aim of protecting human health.

Key words: Air; Allergens; Bacteria; Indoor; Microbiological analysis; Moulds; Sampling techniques; Surfaces

Per informazioni su questo documento scrivere a: lucia.bonadonna@iss.it.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Bonadonna L, Briancesco R, Brunetto B, Coccia AM, De Gironimo V, Della Libera S, Fuselli S, Gucci PMB, Iacovacci P, Lacchetti I, La Rosa G, Meloni P, Paradiso R, Pini C, Semproni M per il Gruppo di Studio Nazionale sull'Inquinamento Indoor. *Strategie di monitoraggio dell'inquinamento di origine biologica dell'aria in ambiente indoor*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2013. (Rapporti ISTISAN 13/37).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Fabrizio Oleari*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988 (serie: *Rapporti e congressi ISTISAN*)

Redazione: *Paola De Castro e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.



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.

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 Federcasalinghe</i>
Anna Santarsiero	<i>Istituto Superiore di Sanità</i>
Genesio Scalonì	<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 Pilozi	<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	<i>Istituto Superiore di Sanità</i>
Rossella Briancesco	<i>Istituto Superiore di Sanità</i>
Barbara Brunetto	<i>Istituto Superiore di Sanità</i>
Anna Maria Coccia	<i>Istituto Superiore di Sanità</i>
Vincenzo De Gironimo	<i>Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale</i>
Simonetta Della Libera	<i>Istituto Superiore di Sanità</i>
Paola Margherita Bianca Gucci	<i>Istituto Superiore di Sanità</i>
Patrizia Iacovacci	<i>Istituto Superiore di Sanità</i>
Giuseppina La Rosa	<i>Istituto Superiore di Sanità</i>
Ines Lacchetti	<i>Istituto Superiore di Sanità</i>
Pierluigi Meloni	<i>Istituto Superiore di Sanità</i>
Rosa Paradiso	<i>Istituto Superiore di Sanità</i>
Carlo Pini	<i>Istituto Superiore di Sanità</i>
Maurizio Semproni	<i>Istituto Superiore di Sanità</i>

INDICE

Presentazione	v
Ambienti <i>indoor</i>: inquinamento biologico	1
Introduzione	1
Caratteristiche del bioaerosol	2
Riferimenti normativi e linee guida	3
Allergeni negli ambienti <i>indoor</i>	5
Acari	6
Scarafaggi	6
Mammiferi	7
Miceti	7
Allergeni occasionali in ambiente <i>indoor</i>	8
Microrganismi negli ambienti <i>indoor</i>	9
Batteri	9
<i>Aeromonas</i> spp	9
Attinomiceti	10
Enterococchi/streptococchi fecali	10
<i>Escherichia coli</i>	11
<i>Legionella</i>	11
Micobatteri	12
<i>Micrococcus</i> spp	13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
<i>Salmonella</i> spp	13
<i>Staphylococcus</i> spp	14
Protozoi	14
Amebe a vita libera	14
Alghe e cianobatteri	15
Funghi	15
Virus negli ambienti <i>indoor</i>	17
Tossine negli ambienti <i>indoor</i>	21
Endotossine batteriche	21
Micotossine	23
Indici di contaminazione microbica	24
Parametri microbiologici	25
Criteri di campionamento e analisi	27
Tecniche di campionamento	28
Campionamento passivo	28
Campionamento attivo	29

Campionamento dell'aria	32
Campionamento di batteri.....	32
Campionamento di virus.....	36
Campionamento di allergeni.....	37
Campionamento di endotossine batteriche	39
Campionamento dalle superfici	42
Campionamento di batteri.....	43
Campionamento di virus.....	46
Campionamento di allergeni.....	46
Metodi di analisi	49
Batteri e funghi	50
Ricerca degli indicatori	50
Ricerca di batteri patogeni.....	54
Ricerca dei funghi	55
Virus	56
Allergeni	57
Endotossine batteriche	60
Bibliografia	64
Norme nazionali e internazionali sulla contaminazione biologica <i>indoor</i>	71

PRESENTAZIONE

Nell'ambito del Gruppo di Studio nazionale (GdS) sull'Inquinamento *Indoor*, istituito nel 2010 presso l'Istituto Superiore di Sanità e composto da esperti dello stesso istituto, di altri enti e istituti di ricerca, università, Ministero della Salute e Regioni, è emersa la necessità di predisporre un documento condiviso che fornisca un indirizzo metodologico univoco per la caratterizzazione e la valutazione degli inquinanti di natura biologica (bioaerosol) in ambienti confinati.

Attualmente, in Italia, non esistono specifici regolamenti che definiscano in maniera puntuale e specifica le procedure di monitoraggio, campionamento e rilevamento degli inquinanti biologici *indoor*. Al fine di contribuire a colmare questa lacuna è stato di conseguenza attivato un gruppo *ad hoc* composto da esperti individuati all'interno dell'Istituto. Il documento ora pubblicato rappresenta quindi il risultato del lavoro del gruppo *ad hoc* ed è rivolto in particolare a quelle strutture che, a vario titolo, sono preposte al controllo e/o allo studio della qualità dell'aria e delle superfici negli ambienti confinati ai fini della tutela della salute umana. Infatti, le attività di monitoraggio degli ambienti *indoor* e la valutazione dei fattori di rischio di esposizione ad agenti biologici rappresentano elementi fondamentali per l'individuazione delle misure necessarie a prevenire e/o a ridurre i livelli di concentrazione degli inquinanti.

In questo contesto si è posta prioritariamente l'attenzione a quelli agenti biologici che più comunemente possono essere presenti in ambienti *indoor*, rappresentati quindi da batteri, funghi filamentosi, virus, ma anche da allergeni e tossine che possono costituire gruppi di inquinanti con caratteristiche intrinseche differenti fra loro e con impatti diversi in relazione a fattori quali persistenza ambientale, capacità di indurre infezioni, malattie, allergie o comunque condizioni di danno all'organismo con cui vengono in contatto.

La World Health Organization nelle "WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould" del 2009 riporta che, in ambienti con un certo grado di umidità, la concentrazione di batteri e funghi può raggiungere valori elevati. Queste condizioni possono condurre a un aumento di sintomi a carattere respiratorio, ad allergie e asma e disordini del sistema immunitario. Da qui anche l'importanza di una valutazione che tenga conto anche di fattori microclimatici e delle attività che si svolgono nello specifico ambiente.

Nella prima fase del lavoro è stata eseguita una revisione della documentazione tecnico-scientifica più aggiornata relativa alla tematica, prendendo anche in considerazione eventuali norme di riferimento disponibili a livello europeo e internazionale, metodiche di campionamento e di analisi.

In generale, il campionamento di agenti biologici nell'aria è basato sugli stessi principi che regolano il campionamento del particolato aerodisperso non biologico. Tuttavia l'esigenza di assicurare la sopravvivenza e l'attività biologica del bioaerosol durante e dopo il prelievo rendono le attività di controllo e monitoraggio diverse da quelle usate per la caratterizzazione chimica delle particelle. Inoltre, la manipolazione e la conservazione del campione, così come l'analisi, presentano considerevoli differenze rispetto a quanto avviene per le particelle non biologiche. È anche per uniformare le procedure analitiche che è stato quindi elaborato questo documento sui metodi microbiologici che può rappresentare un riferimento destinato a tutti gli operatori del settore che eseguono attività di controllo. La ricerca di agenti biologici e l'attività di prevenzione necessaria per realizzare un corretto programma di controllo del livello di concentrazione di bioaerosol negli ambienti *indoor* presuppongono una conoscenza approfondita della materia.

È per questo che il volume acquista un significato estremamente attuale e, in mancanza di requisiti e metodologie ufficiali, fornisce un supporto tecnico utile allo svolgimento di indagini di controllo e ricerca, anche in previsione di eventuali futuri disposti normativi.

Loredana Musmeci
*Direttore del Dipartimento
di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria*

Sergio Fuselli
*Coordinatore del Gruppo di Studio nazionale
sull'Inquinamento Indoor*

AMBIENTI *INDOOR*: INQUINAMENTO BIOLOGICO

Introduzione

È ormai di uso comune definire con il termine *indoor* gli ambienti di vita e di lavoro non industriali e in particolare quelli adibiti a dimora, svago, lavoro e trasporto (1). Tale definizione è stata anche proposta nell'Accordo Stato-Regioni del 27 settembre 2001 (2) riferendola ad abitazioni, uffici pubblici e privati, strutture comunitarie (ospedali, scuole, uffici, caserme, alberghi, banche, ecc.), locali destinati ad attività ricreative e sociali (cinema, ristoranti, bar, negozi, strutture sportive, ecc.), mezzi di trasporto pubblico e privato (auto, treni, aerei, navi, ecc.).

Gli inquinanti *indoor*, che possono agire singolarmente o combinati con altri fattori, determinano una diminuzione del *comfort* ambientale e possono rappresentare un rischio per la salute; sono agenti di tipo chimico (composti organici e inorganici), fisico (radiazioni ionizzanti e non ionizzanti) e biologico (microrganismi, allergeni, virus, ecc.) (3).

Come risulta da alcune indagini condotte a livello europeo, la popolazione dei centri urbani trascorre in media il 95-97% del tempo in ambienti confinati; il 2,4% nei mezzi di trasporto e l'1% in ambienti esterni (*outdoor*) (4). Anche in Italia sono stati condotti studi analoghi sulla popolazione residente in alcune aree urbane al fine di acquisire informazioni dettagliate sugli stili di vita (5, 6).

Nel corso degli ultimi decenni si è assistito a un progressivo deterioramento della qualità dell'aria negli ambienti confinati; numerosi studi scientifici hanno infatti dimostrato la presenza, nell'aria degli ambienti di vita, di agenti inquinanti a bassa concentrazione di difficile misurazione che possono determinare effetti sulla salute non ancora completamente noti (7).

Considerato che gran parte della popolazione trascorre il proprio tempo in ambienti confinati, l'esposizione all'inquinamento *indoor* è dominante rispetto a quella *outdoor*.

È necessario aggiungere che la qualità dell'aria *indoor* dipende, oltre che dalla presenza di sorgenti interne, anche dalla qualità dell'aria esterna. Le principali fonti interne sono determinate dall'uomo e dalle sue attività, dai materiali da costruzione, dagli arredi e dai sistemi di trattamento dell'aria. Sicuramente, una delle fonti di inquinamento più importanti è il fumo di tabacco, oltre ai processi di combustione di combustibili fossili, ai prodotti per la pulizia e la manutenzione della casa, ai prodotti antiparassitari, alle colle, ai solventi e agli strumenti di lavoro quali stampanti, plotter e fotocopiatrici, ecc. (8). Dal punto di vista biologico, d'altra parte, fonti di emissioni specifiche più o meno continue e puntiformi del cosiddetto "bioaerosol" possono essere associate a materiali d'arredo che, in caso di scarse condizioni igieniche e di favorevoli condizioni microclimatiche, possono agire come serbatoi per polvere, allergeni, microrganismi, insetti, ecc., ma anche, oltre ai sistemi di climatizzazione, ad aerosol nebulizzati da soffioni di docce, rubinetti e fontane e alla presenza di vegetazione.

Il bioaerosol, pertanto, può rappresentare una componente importante dell'inquinamento dell'aria *indoor*, dove può venire inalato anche con manifestazione di effetti acuti.

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 (9, 10).

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, presenti come particolato, e composti organici liquidi o volatili, tra cui sottoprodotti del metabolismo microbico (Figura 1) (11).

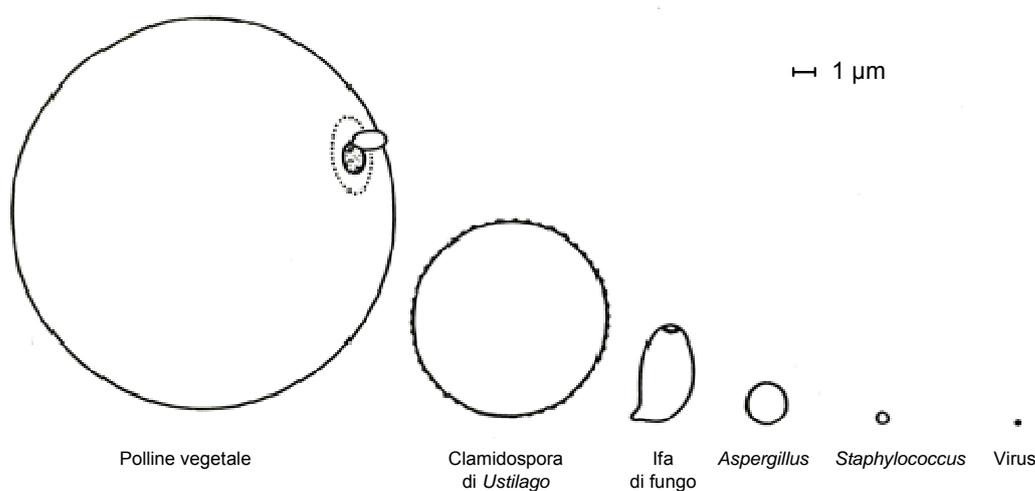


Figura 1. Principali specie di particelle di origine biologica e loro dimensioni

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 (12).

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 (13).

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 al 95-97% 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.

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 (14).

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 (15).

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* e 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 a una legislazione che esprima compiutamente modalità specifiche cui attenersi nell'analisi dell'inquinamento biologico negli ambienti residenziali per trovare indicazioni in questo senso si può fare riferimento ai principali standard

internazionali in materia, come quelli canadesi (Flannigan B, Morey P. *Control of moisture problems affecting biological indoor air quality. ISIAQ guideline*. Ottawa: International Society of Indoor Air and Climate; 1996), quelli dell'*Environmental Protection Agency (Biological pollutants in your home*. <http://www.cpsc.gov/en/safety-education/safety-guides/home/biological-pollutants-in-your-home/>) e quelli della *World Health Organization (WHO Guidelines for indoor air quality: dampness and mould* del 2009 e *WHO Guidelines for indoor air quality: selected pollutants* del 2010).

Sul territorio nazionale, l'esposizione ad agenti biologici è disciplinata dal D.L.vo 81/2008 che, sebbene specifico per gli ambienti di lavoro, nell'Allegato XLVI classifica in maniera puntuale i vari agenti biologici, catalogandoli in base al loro grado di pericolosità.

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 (16).

Per le procedure di monitoraggio del bioaerosol nell'*indoor*, si può far riferimento alla norma UNI EN 13098, specifica per gli ambienti di lavoro, che può essere comunque 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, 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, attualmente in corso di revisione, e, del 2005, le "Linee guida recanti indicazioni sulla legionellosi per i gestori di strutture turistico-ricettive e termali".

In relazione alla presenza di allergeni negli ambienti *indoor*, sono ad oggi disponibili, inoltre, alcune linee guida indirizzate alla gestione del paziente allergico e asmatico. Tra le più importanti:

- *Pocket guide for asthma management and prevention* della *Global Initiative for Asthma* (GINA) (2012).
- *ARIA Workshop Report. Allergic rhinitis and its impact on asthma* (2001);
- *Expert Panel Report 3: Guidelines for the diagnosis and management of asthma* (2007);
- *ICH Q2 (R1). Validation of analytical procedures: text and methodology* (1994).

Tutte le citazioni, relative a linee guide e norme inserite in questo documento, sono riportate in Bibliografia nella sezione "Norme nazionali e internazionali sulla contaminazione biologica *indoor*".

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 e asmatica in individui già sensibilizzati (17, 18).

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

- acari (*Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae*);
- scarafaggi (*Blattella germanica* e *Periplaneta americana*);
- mammiferi (derivati epidermici di animali di *Felis domesticus* e *Canis familiaris*);
- miceti (*Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Alternaria* spp);
- allergeni occasionali in ambiente *indoor*.

Nel 3rd *International Workshop on Indoor Allergen and Asthma* (19), 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 (20).

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 e 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 in soggetti esposti. 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 e 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 (21, 22).

Ad oggi sono disponibili in commercio una serie di kit ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) 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

Tra gli 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 e altre suppellettili domestiche, ma sono stati riscontrati anche in ambienti pubblici. Quindi anche in tali ambienti si possono instaurare condizioni favorevoli allo sviluppo e alla 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 (19).

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 (20). 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

Tra i 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.

Occorre segnalare che la patologia che i miceti 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 in ambiente *indoor*

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 risultarne 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.

MICROORGANISMI 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; inoltre, la presenza di condizioni microclimatiche controllate può determinare 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, oltre a virus e parassiti, diversi tipi di microrganismi che possono essere abbastanza facilmente rilevati e, in particolare:

- batteri di origine ambientale, ubiquitari in tutte le matrici, appartenenti ai generi *Bacillus* o *Micrococcus*, e funghi 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 sopravvivere e proliferare in matrici (es. acqua) e su superfici particolari e che, aerodispersi possono costituire un pericolo per la salute di soggetti immunodepressi, se in concentrazioni elevate (*Legionella*, *Mycobacterium*, ecc.);
- microrganismi tipicamente legati alla presenza di esseri umani o animali, come quelli ad esempio appartenenti ai generi *Staphylococcus*, *Candida*, *Clostridium* che, facenti parte del microbioma umano, possono costituire, tuttavia, un rischio biologico se rappresentati da specie patogene quali *S. aureus*, *C. albicans*, *C. difficile*.
- batteri 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 è più comune ritrovarlo su superfici.

Attinomiceti

Su tratta di 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 (Unità Formanti Colonia)/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 cocchi 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 del microbiota intestinale umano 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 microbica, e nel caso dei batteri Gram-negativi implica l'immediato rilascio di endotossina; per *E.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

Legionelle vivono in ambienti acquatici naturali, acque sorgive, comprese quelle termali, fiumi, laghi, fanghi, ecc. Da qui raggiungono ambienti artificiali come condutture cittadine e impianti idrici degli edifici, fontane e piscine che possono agire come amplificatori e disseminatori del microrganismo, creando una potenziale situazione di rischio per la salute umana. *Legionella* è un bacillo Gram-negativo, aerobio e asporigeno, mobile per la presenza di uno o più flagelli. Il genere comprende 61 diverse specie (e sottospecie) e circa 70 sierogruppi, ma non tutte sono state associate a casi di malattia nell'uomo. *Legionella pneumophila* è la specie più frequentemente rilevata ed è costituita da 16 sierogruppi di cui *L. pneumophila* sierogruppo 1 è causa del 95% delle infezioni in Europa e dell'85% nel mondo.

Non è nota la dose infettante per l'uomo, né si conoscono le ragioni della diversa virulenza nelle differenti specie e nei sierogruppi che tuttavia potrebbero essere attribuite alle condizioni di idrofobicità delle superfici, alla stabilità nell'aerosol e alla capacità di crescere all'interno delle amebe.

La legionellosi viene di norma acquisita per via respiratoria mediante inalazione, aspirazione o microaspirazione di aerosol contenente *Legionella*, oppure di particelle derivate per essiccamento. Goccioline si possono formare sia spruzzando acqua, sia facendo gorgogliare aria in essa o per

impatto su superfici solide. La pericolosità di queste particelle di acqua è inversamente proporzionale alla loro dimensione. Gocce di diametro inferiore a 5 µm arrivano più facilmente alle basse vie respiratorie. Non è mai stata dimostrata la trasmissione interumana della malattia. L'infezione è stata 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 (es. riunito odontoiatrico, per la terapia respiratoria, ecc.), 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. Con il termine "legionellosi" si definiscono tutte le forme morbose causate da batteri gram-negativi aerobi del genere *Legionella*. Essa si può manifestare sia in forma di polmonite con tasso di mortalità variabile tra 10-15%, sia in forma febbrile extrapolmonare o in forma subclinica. La specie più frequentemente coinvolta in casi umani è *L. pneumophila* anche se altre specie sono state isolate da pazienti con polmonite. La legionellosi è una malattia soggetta a notifica obbligatoria in Italia e in Europa.

Essendo il microrganismo ubiquitario, la malattia può manifestarsi con epidemie dovute ad un'unica fonte con limitata esposizione nel tempo e nello spazio all'agente eziologico, oppure con una serie di casi indipendenti in un'area ad alta endemia o con casi sporadici senza un evidente raggruppamento temporale o geografico. Focolai epidemici si sono ripetutamente verificati in ambienti collettivi a residenza temporanea, come ospedali o alberghi, navi da crociera, esposizioni commerciali, ecc.

Anche se non specificatamente indicato per gli ambienti *indoor*, quanto esposto nel DL.vo 9 aprile 2008, n. 81, che considera il rischio derivante da *Legionella* nel Titolo X (Esposizione ad agenti biologici), vale anche per gli ambienti di vita.

Sono state sviluppate procedure di abbattimento delle concentrazioni di *Legionella* negli impianti idrici. Il contenimento delle sue densità richiede un approccio complesso i cui criteri sono dettati da specifiche linee guida europee e nazionali.

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 e 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.

***Micrococcus* spp**

Al genere appartengono batteri di forma coccica, aggregati in coppie, tetradi o grappoli, appartenenti alla famiglia delle *Micrococcaceae*. I micrococchi sono asporigeni, anaerobi facoltativi, gram-positivi, catalasi positivi, prevalentemente mesofili e non dotati di motilità, ad eccezione della specie *M. agilis*, psicofila e provvista di flagelli. Molte specie producono pigmenti carotenoidi e quindi le colonie si presentano colorate.

Si ritiene che il loro *habitat* primario possa essere la pelle, sia umana che animale; tuttavia è possibile rilevare i micrococchi in una vasta gamma di ambienti quali acqua, suolo, polvere e alimenti, quali prodotti lattiero-caseari o birra. Questi batteri sono in grado di moltiplicarsi sia in condizioni di scarsa umidità che in presenza di concentrazioni saline piuttosto elevate. Le specie più comunemente rinvenute nell'ambiente sono *M. luteus*, *M. roseus*, *M. kristinae* e *M. varians*.

Sebbene il genere *Micrococcus* sia un contaminante comune della pelle umana, quale saprofito o commensale, può essere coinvolto in numerose infezioni e comportarsi da patogeno opportunisto essendo responsabile di batteriemia, shock settico, artrite settica, endocardite, meningite o polmonite in soggetti immunocompromessi o immunodepressi, particolarmente nel caso di pazienti con HIV.

La presenza di batteri appartenenti a questo genere è segnalata raramente nell'aria, mentre è più comune il loro ritrovamento su superfici contaminate dal punto di vista antropico (23).

Pseudomonas aeruginosa

È un 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 noto anche perché implicato in infezioni polmonari croniche in 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, soprattutto interessate da condizioni di umidità.

***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 è possibile isolarla da superfici particolari di abitazioni (e altri ambienti *indoor* in associazione con la frequentazione umana e/o animale), ecc.

Staphylococcus spp

Gli stafilococchi sono cocchi 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, e altre ancora opportuniste patogene. Possono produrre diverse tossine, esoenzimi, enzimi lipolitici e coagulasi. Solo *S. aureus* è realmente considerato patogeno, tuttavia, in genere, possono rappresentare un rischio per la salute umana tutte le specie coagulasi-positive che possono comprendere anche alcuni opportunisti patogeni.

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 e interessano la cute e gli annessi cutanei (follicoliti, foruncoli, favi, pustole, bolle, vescicole, ascessi, piodermiti, 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 e 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 (*bloom*). 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 segnalata in acque di fontane all'interno di edifici adibiti a esercizi di vendita.

Funghi

Si stima che oltre 200.000 differenti specie di funghi partecipino alla trasformazione delle sostanze organiche in natura, ma fortunatamente solo pochi di questi causano malattie negli uomini. I funghi possono danneggiare la salute dell'uomo inducendo ipersensibilità, reazioni allergiche, micotossicosi, micetismo, micosi.

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. Non possiedono clorofilla e non sono mobili (con l'eccezione di alcuni tipi di spore). Possiedono una parete cellulare rigida composta da chitina e si riproducono sessualmente con formazione di spore e, asessualmente 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*, *Stachybotris* 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 simbionti. 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. A questo proposito è stato ipotizzato che i cambiamenti climatici potrebbero rappresentare condizioni che favoriscono l'aumento della diffusione di alcune specie fungine produttrici di micotossine.

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.

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 (24); successivamente enterovirus (coxsackievirus A-21) sono stati identificati nell'aria di una stanza occupata da volontari con infezione respiratoria acuta (25). Negli anni '80 del secolo scorso sono state pubblicate le prime rassegne sui virus in ambienti *indoor* (25-26). 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 (27). 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 (28); inoltre concentrazioni più elevate sono state rilevate negli ambienti con più elevato numero di pazienti con sintomi influenzali (28). Virus dell'influenza sono stati inoltre identificati direttamente nelle emissioni di pazienti durante la respirazione, la fonazione e la tosse volontaria (29). 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 (30 - 32). 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 (32). 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 (33).

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 (34). Rhinovirus sono stati identificati nelle emissioni di tosse e starnuti e in campioni di aerosol raccolti in ambienti *indoor*, in presenza di pazienti sintomatici (35). Sono inoltre stati identificati in veicoli di trasporto e uffici pubblici (34; 36). In letteratura sono documentate epidemie in strutture sanitarie e residenziali (37 - 38), come pure casi di trasmissione intrafamiliare (39).

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. Inoltre, volontari suscettibili esposti nella stessa stanza a distanza dai volontari infetti hanno sviluppato l'infezione in pochi giorni (40). 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 (41). 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) (42). Sono inoltre documentate epidemie in reparti ospedalieri di neonatologia e in asili nido (43-44).

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 (*Severe Acute Respiratory Syndrome*, 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 (45), la trasmissione in un hotel da un ospite a numerosi clienti che soggiornavano sullo stesso piano (46), l'epidemia in un grande complesso residenziale a Hong Kong in cui si sono verificati più di 300 casi di SARS in poche settimane (47). Infine, cluster 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) (48), 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 (42).

Negli anni '50 del secolo scorso 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 (49). Da allora sono documentate epidemie in diverse tipologie di ambienti confinati, incluse strutture sanitarie, assistenziali e scuole (50-52). 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% (53). Sono documentate epidemie in case di cura e strutture di assistenza per anziani (54-55). Inoltre il virus è stato identificato nell'aerosol di stanze di degenza in ospedali e in altre strutture sanitarie (28, 56) 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) (57). 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 (58).

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.

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 (59).

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 denomina 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 (Unità di Endotossina)/mg (60).

Secondo una ricerca (61), 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 (62). 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 (63).

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 (64). Il calore secco è una condizione indispensabile alla depirrogenizzazione. 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 (65).

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 esotossine classiche. Tuttavia, i LPS sono uno dei più potenti stimolatori infiammatori a tutt'oggi conosciuti (66). 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 (67-68).

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 (69-70).

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 (71-74). È stato osservato, infatti, che la risposta infiammatoria dose-dipendente incrementa l'umore negativo e gli stati d'ansia (75).

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 (76), inalazione (77-79) 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* (80).

Le micotossine possono essere costituite da alcaloidi, ciclopeptidi e cumarine (79), o da strutture aromatiche, fenoliche e terpenoidi (81). 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 (81 - 84).

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 (85).

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 (per la distribuzione dell'aria, ma anche dell'acqua), le caratteristiche di circolazione dell'aria, anche proveniente dall'esterno, e 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 di eventuali impianti di climatizzazione e di impianti di distribuzione dell'acqua (possibilità di aerosolizzazione);
- 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 attraverso l'aria, mentre per altri, invece, la dose infettante minima è nota e stimabile intorno a poche unità (es. virus).

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 (86).

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 1) che potrebbero consentire di valutare la qualità dell'aria *indoor*; tali valori non implicano comunque un giudizio di rischio per i soggetti esposti (87).

Tabella 1. Valori di carica microbica e livello di inquinamento *indoor* in diversi ambienti

Livello di inquinamento <i>indoor</i>	Abitazioni		Ambienti non industriali	
	batteri	funghi	batteri	funghi
	UFC/m ³		UFC/m ³	
Molto basso	< 100	< 50	< 50	< 25
Basso	< 500	< 200	< 100	< 100
Intermedio	< 2500	< 1000	< 500	< 500
Alto	< 10000	< 10000	< 2000	< 2000
Molto alto	> 10000	> 10000	> 2000	> 2000

A livello italiano, per la misura dell'inquinamento microbico in ambienti *indoor*, da alcuni autori sono stati proposti indici di contaminazione finalizzati a fornire una valutazione semi-quantitativa dell'inquinamento microbiologico aereodiffuso (88-89):

- *Indice Globale di Contaminazione Microbica (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 (90).

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 base i parametri microbiologici da ricercare saranno rappresentati da:

- *Carica batterica psicrofila*
batteri con crescita intorno ai 22°C (intervallo 15-30°C), considerati indicatori di contaminazione microbica ambientale;

- *Carica batterica mesofila*
batteri con crescita intorno ai 37°C (intervallo 25-40°C), considerati indicatori di contaminazione di origine umana o animale;
- *Carica fungina*
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 moltiplicazione anche in condizioni ambientali estreme, divenendo valido indicatore della presenza di batteri Gram-negativi vitali ma difficilmente coltivabili; *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp), 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;
- microrganismi con caratteristiche specifiche (es. *Legionella* spp).

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 sé 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.

CRITERI DI CAMPIONAMENTO E ANALISI

I criteri di indagine impiegati per la valutazione della qualità microbiologica di ambienti di vita possono derivare da quelli utilizzati per la valutazione delle caratteristiche di qualità di altri tipi di ambienti *indoor*. 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 e in base alla specifica finalità.

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 (91).

Determinanti per la definizione della qualità dell'aria *indoor* sono la scelta dei punti di campionamento, la tecnica di campionamento e la sua durata, il numero di campioni, la valutazione degli eventuali cambiamenti delle condizioni ambientali durante il campionamento e le tecniche da utilizzare per l'analisi (92).

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 condizione 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 potenzialmente risultati differenziati riguardo la complessa componente microbica presente in funzione della tecnica utilizzata (93).

Si dovrà quindi tener conto che, confrontando le conte dei microrganismi aerodispersi raccolti con tecniche diverse, si potrebbero trovare variazioni di concentrazione per effetto sia della loro distribuzione non uniforme sia delle procedure di prelievo e analisi.

Pertanto, è complesso accertare con precisione l'origine delle emissioni e 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 e aumentando i volumi di campionamento potrebbe essere superata ma che verrebbe, tuttavia, a incidere sulla vitalità dei microrganismi che potrebbero quindi non essere rilevati.

Infine, la pianificazione statistica delle indagini ambientali mirate alla determinazione del 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 (91).

Due sono le tipologie di campionamento (passivo e attivo) e 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. Il campionamento attivo risulta tuttavia più efficiente e performante.

Tecniche di campionamento

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: 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 stato utilizzato soprattutto per il monitoraggio dell'inquinamento microbiologico di ambienti controllati, all'interno dei quali non c'è bisogno di tener conto di condizioni di ventilazione e di movimentazione d'aria, come le camere operatorie e le camere asettiche. Questi siti sono stati i primi dove si è cominciato ad indagare e ad accertare l'entità della carica microbica ambientale; non erano allora, pertanto, disponibili gli strumenti che sono stati poi sviluppati per i più sofisticati sistemi di campionamento attivo.

Inoltre, il metodo passivo, ove ancora utilizzato poiché legato ad una concezione più semplice e tradizionale del campionamento dell'aria, ha lo svantaggio di non essere quantitativo. Infatti non permette di correlare il numero di microrganismi raccolti ad un volume noto di aria e, essendo il tasso di deposizione in funzione della massa posseduta, sovrastima i microrganismi contenuti nelle particelle dotate di maggiori dimensioni.

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

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).

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.

Per la scelta del sistema di campionamento che di volta in volta potrebbe essere più adatto per l'indagine da eseguire, è bene tenere conto di quanto riportato nella norma (Parte 1 e Parte 2) di seguito indicata, conforme a esigenze di controllo dell'inquinamento e della qualità microbiologica dell'aria:

- UNI EN ISO 14698-1:2004. *Camere bianche e ambienti associati controllati - Controllo della biocontaminazione - Parte 1: Principi generali e metodi*;
- UNI EN ISO 14698-2:2004. *Camere bianche e ambienti associati controllati - Controllo della biocontaminazione - Parte 2: Valutazione e interpretazione dei dati di biocontaminazione*.

Si tratta di una norma specifica che riporta raccomandazioni e metodi per monitorare e classificare i livelli di inquinamento biologico (biocontaminazione) nelle camere bianche e negli ambienti asettici, tematiche considerate ormai da tempo di primaria importanza non solo nelle strutture sanitarie e biotecnologiche, ma anche nell'industria farmaceutica, cosmetica e alimentare.

La Parte 1 della norma specifica i metodi richiesti per il monitoraggio sistematico delle zone a rischio e per l'applicazione delle misure di controllo adeguate al grado di rischio presente. Nelle zone a basso rischio, o comunque dove la biocontaminazione non è un problema altrettanto pressante, la norma essa può essere utilizzata come fonte di informazioni.

Diversamente, la Parte 2 presenta un quadro di riferimento per la valutazione dei dati di biocontaminazione raccolti seguendo i principi e i metodi forniti nella Parte 1, ma può essere applicata anche a dati di biocontaminazione raccolti con altri sistemi. La norma, nella sua completezza, può, quindi, rappresentare un riferimento importante per i controlli della qualità ambientale *indoor*.

Una parte importante della norma riguarda i criteri di scelta per il sistema di campionamento più adatto in relazione alla tipologia e alle dimensioni delle particelle ricercate, alla sensibilità o resistenza del particolato da determinare, al livello di carica microbica che ci si aspetta di trovare, alla durata delle sessioni di prelievo, ecc.

Viene inoltre considerato l'impatto dell'apparecchiatura sull'ambiente da monitorare (l'aria di scarico non dovrebbe disturbare l'area di campionamento né essere riaspirata dall'apparecchiatura) e stimata la rappresentatività del campione.

La norma definisce anche due caratteristiche principali per ogni campionatore che venga utilizzato:

1. un flusso d'aria sufficiente a raccogliere 1 m³ in un lasso di tempo "ragionevole" e
2. un'adeguata velocità d'impatto (intorno ai 20 m/s), che sia abbastanza alta per raccogliere particelle del diametro di 1 µm, ma abbastanza moderata per preservare la vitalità e la coltivabilità dei microrganismi raccolti. Infatti, un flusso d'aria elevato, che abbia una velocità d'impatto troppo elevata, tenderebbe ad essiccare il mezzo di raccolta e stresserebbe i microrganismi.

Inoltre, relativamente alle procedure operative e di installazione delle attrezzature di prelievo, è necessario considerare l'ergonomia, la decontaminazione e la gestione di tutto l'allestimento prima di cominciare il lavoro.

Questa fase di studio preliminare, oltre ai sopralluoghi negli ambienti che andranno monitorati, in pratica si traduce nell'acquisizione dei manuali e della documentazione relativa al sistema di campionamento per valutarne caratteristiche ed efficienza, conoscendo:

- il volume d'aria aspirata nell'unità di tempo, ritenendo ottimale una portata di 100-180 litri/minuto (sufficiente per campionare 1 metro cubo di aria in 6-10 minuti), per ottenere un volume di una certa consistenza e in un tempo di campionamento non troppo lungo;
- la portabilità, specialmente se i prelievi effettuati nel corso di una stessa sessione di campionamento riguardano più di un ambiente, dando quindi la preferenza ad un campionatore che sia leggero, di facile manipolazione e con comandi semplici;
- la possibilità di un campionamento multiplo, qualora si intenda procedere con un prelievo in doppio e/o per valutare contemporaneamente sia la presenza batterica che fungina. Un campionatore a doppia testata di aspirazione, ad esempio, consente di eseguire in un solo lasso di tempo due prelievi, con lo stesso terreno per un campionamento in doppio, in modo da poter poi calcolare la media, oppure con terreni nutritivi specifici per due tipi di conte diverse;
- le possibilità di posizionamento, la disponibilità di tutti gli accessori necessari (treppiede, supporto da parete o da tavolo, ecc.) ed eventualmente di un telecomando qualora vi sia la necessità che l'operatore si trovi a distanza, per non introdurre perturbazioni nell'ambiente;
- la possibilità di impiegare materiali di consumo quali capsule Petri, *Contact Plate* o *strip* di terreno acquistabili solo dal produttore dell'apparecchio, oppure standard provenienti

da diversi fornitori col probabile vantaggio di avere migliore reperibilità e costi di esercizio più bassi in confronto al materiale di consumo apposito di un solo fornitore. Valutare pure le modalità di inserimento ed estrazione di tali materiali, in modo da evitare il rischio di una possibile contaminazione da parte dell'operatore;

- l'eventualità che il campionatore sia predisposto per ulteriori impieghi (es. il monitoraggio dell'aria compressa nelle camere bianche);
- la facilità di pulizia e disinfezione dell'apparecchio, nonché di sterilizzazione della testata di aspirazione prima dell'introduzione in ambienti puliti e con atmosfera controllata, in relazione ai materiali di costruzione e all'eventuale utilizzo di testate sterilizzate pronte all'uso, in confezioni monouso;
- trattandosi di apparecchi portatili, la possibilità di alimentazione anche a batteria ricaricabile, che, da sola o con ricambi in dotazione, dovrà avere una durata congrua per potere eseguire una quantità di cicli di campionamento assimilabili alla durata di una giornata lavorativa sul campo (4-6 ore o 20-30 m³ d'aria).
- la facile disponibilità per interventi di manutenzione o di ricambio in caso di necessità.

CAMPIONAMENTO DELL'ARIA

Il campionamento del bioaerosol può essere effettuato per numerosi e diversi scopi scientifici e di controllo (di controllo, 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, virus, spore, miceti), 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.

Per il punto di prelevamento 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 un'altezza media delle prime vie respiratorie umane.

Campionamento di batteri

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.

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.

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 più diffusi 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, 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 (94).

– *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.

– *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 fondamentalmente 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 (95). 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 causandone una sottostima al dato finale.

A impatto ortogonale è il campionatore tipo *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 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.

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 campionamento con questo tipo di apparecchio potrebbe, tuttavia, determinare una sottostima del rischio biologico a causa di fenomeni di aggregazione microbica sulla piastra (96).

– *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 può essere utilizzato per il campionamento 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. Per questo diventa importante la scelta del tipo di membrana utilizzata.

Infatti, 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 policarbonato*: 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. È stato dimostrato, infatti, che questi filtri sono fino a 10 volte più

efficienti nella cattura dei virus rispetto a filtri in politetrafluoroetilene o in policarbonato (97-98). 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/m³ anziché come UFC/m³. 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 più compatibile con l'impatto dei 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 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 (*liquid impinger*). 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. Il metodo è 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. Un'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 con sistema aspirante esterno (*impinger*), 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. 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 (99).

I campionatori a gorgogliamento (*biosampler*) 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 *impinger* tradizionali (a 8 ore) la durata di captazione può essere aumentata di 1-1,5 ore.

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 di 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 del secolo scorso, per valutare i metodi di campionamento e analisi più idonei per l'identificazione di virus (limitatamente all'aria *indoor*) (100). 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 sono state 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. 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 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. Nell'ambito di questo specifico sistema di campionamento, anche per i virus i dispositivi più utilizzati sono stati gli impattatori AGI, come i sistemi AGI-30 e AGI-4, largamente impiegati per la determinazione di diversi gruppi di virus *airborne*. Tuttavia, in termini di efficienze di recupero e comparazione con metodi diversi di campionamento, i risultati sono piuttosto contrastanti (101-108).

Altri sistemi di captazione utilizzati per raccolta di virus da aerosol sono i dispositivi tipo *biosampler*, utilizzati per la prima volta nel 1998 (109); 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 di tempo più lunghi senza che vengano danneggiate le bioparticelle adsorbite e riducono i rischi di riaerosolizzazione delle particelle stesse (110). Dispositivi *biosampler* sono stati utilizzati soprattutto per campionamenti di virus influenzali in diversi ambienti confinati (111-113).

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 (94). Le particelle virali campionate con questo sistema, e che impattano sulla superficie solida, devono essere immediatamente risospese in un mezzo liquido.

Anche campionatori tipo il SAS possono essere impiegati 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 (*Tryptic Soy Agar*) o LMA (*Low Melting Agarose*) possono essere eluite, utilizzando per esempio Beef Extract pH 9 e l'eluato omogeneizzato e chiarificato mediante centrifugazione (114-116). 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 (56, 117), in politetrafluoroetilene (34, 118), in policarbonato (119-121). Tuttavia il loro utilizzo è limitato poiché può provocare danni strutturali alle particelle virali. Negli ultimi anni sono state utilizzate, in alternativa, membrane filtranti in gelatina contenute in capsule sterili. Tali membrane influenzano meno l'infettività dei virus poiché durante il campionamento mantengono un ambiente umido e quindi 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. Le caratteristiche e le capacità di questi filtri sono state anche descritte nella parte sul campionamento dei batteri.

Campionamento di allergeni

Il campionamento dell'aria in campo allergologico viene utilizzato principalmente per il monitoraggio *outdoor*, prevalentemente per valutare la qualità e quantità dei pollini aerodispersi. *Indoor* campionamenti di questo tipo sono raramente impiegati e vengono eseguiti

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 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 (il terreno va scelto in base al microrganismo che si intende far crescere). Tale terreno può essere reso più selettivo per le specie fungine 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 la quantificazione degli allergeni.

Come già esposto, il campionamento per gli allergeni dell'aria è più indicato in ambienti *outdoor*. Tuttavia nei casi di edifici chiaramente contaminati e colonizzati da muffe può diventare rilevante valutarne la presenza e, quindi, isolare, identificare e quantificare tali contaminanti (122).

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'innequivocabile

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 (19). Da qui la necessità di acquisire ulteriori dati.

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 e 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 e 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, per 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 (es. sui sistemi di areazione e riscaldamento) e sulle procedure di pulizia degli ambienti interessati dal campionamento e dalle operazioni di misura.

Campionamento di endotossine batteriche

La determinazione delle endotossine batteriche è stata affrontata e condotta soprattutto in relazione al rischio di esposizione in 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 14031:2005 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.

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.

Le procedure 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 la procedura di estrazione utilizzata 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.

Di seguito vengono descritte le procedure di campionamento:

– *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, in seguito a congelamento, le endotossine si mantengono più 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 può essere utilizzato il metodo *impinger*, basato sul gorgogliamento dell'aria campionata in una matrice liquida nella quale viene a concentrarsi il materiale disperso campionato.

Anche il *biosampler* 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 *biosampler* 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).

CAMPIONAMENTO DALLE SUPERFICI

Negli ambienti *indoor*, le superfici possono rappresentare un substrato ideale per la presenza potenziale di elementi nutritivi in grado di supportare e favorire lo sviluppo della flora microbica che vi si viene a depositare con modalità di contatto diretto e/o attraverso l'aria. Il campionamento delle superfici è importante, quindi, per conoscere il *fall-out* microbico ovvero quella componente batterica, fungina, ecc. 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 se correttamente detersa e disinfettata, non deve possedere elevate quantità di quelle molecole ritenute indicatori di uno scarso 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 che, in linea generale, sono riferibili al metodo della spugna, degli *slide* flessibili, delle piastre a contatto (es. *Compact Dry*, *Rodac Weight*, *Maxi Contact Plate*) e dei tamponi (*swabs*).

Il metodo di base, più semplice e adatto a campionare superfici più ampie rispetto a tamponi o piastre a contatto, è il metodo della spugna che prevede l'utilizzo di spugnette imbevute con soluzione sterile che vengono strofinate sulla superficie delimitata da testare e sottoposte a trattamento di omogeneizzazione/eluizione. Il campione così ottenuto viene seminato in piastra con la tecnica dell'inclusione in agar.

Altra tecnica rapida disponibile in commercio è quella degli *slide* flessibili, pronti per l'uso, che 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 di rilevare la concentrazione dell'adenosin-tri-fosfato (*Adenosine TriPhosphate*, ATP), molecola ubiquitaria nei microrganismi e nelle cellule animali e vegetali. L'ATP, che interviene come molecola di scambio e di accumulo energetico nelle reazioni enzimatiche, fornisce quindi un indice direttamente proporzionale alla presenza di biomassa microbica.

La metodica biochimica consente una veloce analisi attraverso la lettura del valore della bioluminescenza, rilevata impiegando la reazione luciferina-luciferasi. La biochimica di questa reazione avviene grazie alla reazione tra l'enzima luciferasi e il suo substrato luciferina e l'ATP. Considerando che una cellula danneggiata o morta non è più in grado di produrre questa molecola e che la quantità residua ancora presente subisce un processo di degradazione, la quantificazione dell'ATP organico può dunque essere un ottimo indice della presenza di cellule viventi.

La reazione di bioluminescenza si attiva con livelli di ATP estremamente bassi. Ciò ha permesso di applicare tale reazione, con opportuni protocolli di preparazione, alla valutazione

della presenza microbica in campioni di varia natura e con gradi di contaminazione molto bassa o nulla. L'analisi di bioluminescenza non permette dunque di discriminare né il tipo né la specie di contaminante, ma di fatto può rapidamente dare una valutazione estremamente precisa paragonabile a un test di "conta totale".

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, 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.

Campionamento di batteri

Per il campionamento dei batteri si possono usare le seguenti tecniche:

– *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 da campionare. Per avere maggiore possibilità di recupero e maggiore rappresentatività del dato, è consigliabile effettuare prelievi in doppio sulla medesima superficie 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 presenti sulla superficie da controllare.

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 l'isolamento di diversi microrganismi.

Selezionare la piastra con il terreno più adatto in funzione della determinazione da eseguire. Per l'indagine sui batteri eterotrofi, è consigliabile utilizzare due piastre di Agar all'estratto di lievito o equivalenti per le due diverse temperature di rilevamento, per la determinazione dei funghi utilizzare *Potato Dextrose Agar* (PDA), Dichloran Glicerolo (DG18), il substrato *Yeast Peptone Dextrose Agar* (YPD) a formulazione parziale (a base di estratto di lievito, peptone e destrosio), *Dichloran Rose Bengal Agar*, *Malt Extract Agar* o *Sabouraud Dextrose Agar*, ai quali può essere aggiunto cloramfenicolo come agente selettivo per inibire la crescita di batteri concomitanti e, in caso di determinazione

di funghi dermatofiti, utilizzare Dermasel Agar o equivalenti. 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, uniforme e costante sull'intera area, per 10 secondi, eventualmente utilizzare i dispositivi appositi per ottenere pressioni costanti.

Il trasporto dei campioni deve avvenire in condizioni refrigerate (5 ± 3)°C affinché non ne vengano alterate le caratteristiche.

Le piastre, appena giunte in laboratorio, devono essere poste a incubare. Nel caso ciò non sia possibile, incubare comunque le piastre entro 12 ore dal campionamento.

Di seguito le diverse procedure di incubazione:

- 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 ± 24) ore in incubatore termostato.
- Per il conteggio dei funghi incubare alla temperatura di $(22\div 25)$ °C in incubatore termostato per $(3\div 5)$ giorni.
- Per il conteggio dei dermatofiti incubare alla temperatura di $(25\div 30)$ °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 UFC per cm^2 :

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

dove:

N = numero di colonie contate;

S = superficie in cm^2 della piastra da contatto utilizzata (ad esempio una piastra da contatto del diametro di 65 mm ha una superficie di $33,2 \text{ cm}^2$).

– *Tecnica dei tamponi*

Questo metodo prevede l'uso di tamponi ed è maggiormente impiegato per prelievi da superfici irregolari. È quindi particolarmente utile per effettuare prelievi da superfici interstiziali difficilmente raggiungibili con la tecnica delle piastre da contatto. A differenza del metodo delle piastre a 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. Quindi bisogna tener presente che durante questo periodo si dovrà mantenere la vitalità di tutti gli organismi presenti nel campione riducendo al minimo ogni possibile alterazione della concentrazione originaria. Per tale scopo si può ricorrere a utilizzo di soluzione fisiologica tamponata, o anche ad appositi terreni che escludono la presenza di fonti di carbonio, azoto e fattori di crescita organica per evitare la moltiplicazione microbica. Per esempio, esistono in commercio:

- il Terreno di Trasporto di Stuart, sostanzialmente privo di nutrienti, che si presenta come un gel contenente sodio tioglicolato come antiossidante, cloruro di calcio insieme a sodio glicerofosfato come agenti tampone e blu di metilene che agisce

come indicatore di ossidoriduzione (il colore blu indica la presenza di ossigeno). I microrganismi raccolti, anche patogeni, possono sopravvivere dalle 6 alle 8 settimane a temperatura ambiente, anche se si raccomanda sempre di inviare il campione in laboratorio il più presto possibile. Per il trasporto di organismi particolarmente delicati, con questo terreno è possibile utilizzare tamponi impregnati di carbone come neutralizzante;

- il Terreno di Ames, simile al precedente, è un terreno di trasporto che si presenta come un gel privo di nutrienti, tamponato con sali fosfati, fornisce un ambiente riducente grazie alla presenza di sodio tioglicolato. Può essere utilizzato per isolare organismi aerobi e anaerobi. In questo caso, si raccomanda di inviare i campioni in laboratorio entro 2 ore dal prelievo e comunque non oltre le 48 ore. È possibile utilizzare tamponi impregnati di carbone come neutralizzante per il trasporto di organismi particolarmente delicati.

Sono pure disponibili in commercio tamponi in kit già preparati con una soluzione di trasporto contenente agenti neutralizzanti che, in accordo con la norma ISO 18593: 2004, agiscono inattivando i più comuni disinfettanti o agenti sanitizzanti che potrebbero trovarsi sulle superfici campionate (composti fenolici, ipoclorito, aldeidi) proteggendo così i microrganismi raccolti fino al momento dell'analisi.

Il prelievo quindi 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.

La procedura base di analisi può prevedere le fasi di seguito descritte:

- 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 preferibilmente in doppio.

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

Per la ricerca dei batteri eterotrofi, distinti in psicrofili e mesofili, utilizzare il terreno Agar all'estratto di lievito o equivalente.

Per la ricerca dei funghi utilizzare PDA, DG18, il substrato YPD a formulazione parziale (a base di estratto di lievito, peptone e destrosio), *Dichloran Rose Bengal Agar*, *Malt Extract Agar* o *Sabouraud Dextrose Agar*, ai quali può essere aggiunto cloramfenicolo come agente selettivo per inibire la crescita di batteri concomitanti.

Per la determinazione dei funghi dermatofiti utilizzare Dermasel Agar o equivalente.

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 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 = eventuale fattore di diluizione

100 = superficie tamponata corrispondente.

Campionamento di virus

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

I protocolli più largamente utilizzati per l'identificazione di virus da superfici sono descritti in una recente rassegna di Julian *et al.* (123) 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 quello con tamponi di poliestere preumidificati ed eluiti con soluzione di Ringer (concentrazione 1/4).

Campionamento di 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, 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 dà 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 scelta del campionamento delle superfici è legata ad una serie di fattori, primo fra tutto, la caratteristica che i principali allergeni *indoor*, 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. Allo stesso modo, gli allergeni derivanti dagli animali domestici (gatto e 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. Questa stessa peculiarità consente a tali particelle di viaggiare associate alla polvere sedimentata. L'importanza del campionamento delle superfici è legata anche alla dimensione delle particelle su cui gli allergeni vengono trasportati, dimensioni che variano generalmente dai 5 ai 40 μm , con possibilità di depositarsi in tempi rapidi.

Per la raccolta dalle superfici delle polveri sedimentate viene utilizzato solitamente un comune aspirapolvere, la cui potenza massima è di 1800 W. È richiesta una potenza totale dello strumento superiore rispetto alla potenza d'uso che in genere è 1600 W, per evitare che lo strumento 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. Tali beccucci dispongono di un apposito spazio all'interno del quale vengono adattati 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 dal contenitore il filtro, inserirlo 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 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. È inoltre necessario verificare che ci sia un contatto ottimale del beccuccio adattatore rispetto alla superficie che si sta campionando e che durante la raccolta non si favorisca l'aerodispersione.

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 specifico del campionamento.

Generalmente, se si vuole saggiare l'effetto dell'applicazione di un determinato trattamento anti-allergene, ad esempio un acaricida, è più opportuno limitare il campionamento alla superficie su cui 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 gli allergeni presenti in un determinato ambiente, è opportuno selezionare i 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 della carica allergenica, non più rappresentativa dell'ambiente in esame in condizioni normali. 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 della polvere, 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 per il campione (sacchetto di plastica). Prima di procedere ad un nuovo prelievo è necessario lavare il beccuccio con detergente, risciacquare con acqua corrente, asciugare accuratamente e 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 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 e refrigerata ($5\pm 3^\circ\text{C}$) dal luogo di raccolta al luogo di analisi utilizzando, ad esempio, una borsa-frigo con piastre eutettiche. 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 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).

METODI DI ANALISI

È noto che i microrganismi sottoposti a condizioni di stress ambientale, come quelle che essi possono trovare nell'aria, 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 (124).

Tuttavia, 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 (es. endotossine batteriche). Inoltre è da sottolineare che, nell'uso di metodi colturali per il controllo dei microrganismi presenti nell'aria *indoor* dove si trovano dispersi in misura non uniforme e sono più "stressati" rispetto a quelli diffusi in altri ambienti, 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 e 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 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, soprattutto, sono comunque tuttora scarsamente applicate nel monitoraggio del bioaerosol.

Con la metodica colturale diretta gli organismi vitali raccolti dall'aria si evidenziano e si enumerano come UFC e possono essere identificati macroscopicamente o mediante test biochimici. Questa procedura analitica può essere utilizzata quando il campionamento è effettuato con campionatori filtranti e aspiranti (tipo Andersen) e per stimare il conteggio in 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, anche se le colture in terreno agarizzato forniscono sempre sottostime delle concentrazioni reali dei microrganismi presenti negli aerosol. Le cause possono essere dovute a:

- richiesta di crescita molto specializzata da parte di alcuni organismi; infatti, per quanto il terreno per la crescita possa essere selettivo e specifico, il rilevamento quantitativo può dare risultati negativi o valori più bassi di quelli reali in quanto i microrganismi, stressati, non riescono a sviluppare colonie;
- produzione da parte di alcuni microrganismi di sostanze che possono rallentare o inibire del tutto la crescita di altri che quindi non vengono rilevati;
- 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;
- disidratazione e conseguente morte dei microrganismi durante il periodo di campionamento mediante filtrazione dell'aria .

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 di batteri (indicatori) 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 non selettivi che permettono la crescita di una larga fascia di microrganismi.

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

Per l'identificazione e la 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 distintivi 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. Per queste determinazioni si rimanda ai test specifici.

Ricerca degli indicatori

Se non esplicitamente richiesto, la valutazione della qualità dell'aria *indoor* viene effettuata attraverso la stima dei microrganismi vitali, coltivabili con tempi e temperature di incubazione mirati a mettere in evidenza quelli di specifica natura ambientale (25-30°C), o di più ristretta origine umana (30-37°C).

Anche nella matrice aria *Escherichia coli*, segnale indubbio di presenza di materiale di origine fecale, così come *Klebsiella* spp, possono essere ricercati in qualità di batteri indicatori di contaminazione fecale.

Per determinare il contributo antropico alla contaminazione dell'aria, in qualità di indicatori possono essere anche determinanti i batteri del gruppo degli Stafilococchi, mentre per stimare la componente dei batteri Gram-negativi vitali può essere ricercato il parametro *Pseudomonas* spp.

In ambienti fortemente umidi, 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 vengano eseguiti con 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 vengano 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 un 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 con le stesse procedure analitiche utilizzate per l'analisi delle acque. Pertanto, l'analisi della sospensione ottenuta può essere eseguita con la tecnica della filtrazione su membrana per determinare i microrganismi in indagine utilizzando terreni colturali selettivi.

Questa tecnica, nella normale attività di un laboratorio di microbiologia, permette una semplificazione degli schemi operativi consentendo di trattenere e di coltivare direttamente sulla 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 (meglio ancora 0,22 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. Tuttavia, 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, influenzando quindi la vitalità e, di conseguenza, la possibilità di crescita dei microrganismi.

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 la crescita dei microrganismi rilevabili negli ambienti *indoor*. In alternativa, è possibile utilizzare le piastre con terreni colturali già pronte, disponibili in commercio.

Per i diversi microrganismi possono essere utilizzate le procedure di seguito descritte:

- *Eterotrofi vitali 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 agenti nutritivi. 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. L'aria, tuttavia, è una matrice strettamente oligotrofa e pertanto può essere alternativamente utilizzato il terreno R2A 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 psicrofili, e a 37°C per almeno (48÷72) ore per la crescita delle colonie dei batteri mesofili. Per quanto riguarda la ricerca di microrganismi di non stretta origine ambientale, che si ipotizzano presenti nell'aria di ambienti *indoor*, possono essere impiegati terreni agarizzati che contengano sangue (cavallo o montone) come supplemento per fornire condizioni di crescita adeguate per il loro recupero. La presenza del sangue, oltre che soddisfare le richieste di alcuni organismi particolarmente esigenti dal punto di vista nutrizionale, è utile per la determinazione dell'emolisi, che è un criterio diagnostico nella procedura per giungere all'identificazione della specie batterica. In questo caso, l'incubazione può essere effettuata per (18÷24) ore a 37°C.

– *Carica fungina*

I miceti possono essere quantificati mediante numerosi e diversificati terreni di isolamento a formulazione completa quali, per esempio, PDA, DG18, il substrato YPD a formulazione parziale (a base di estratto di lievito, peptone e destrosio), *Dichloran Rose Bengal Agar*, *Malt Extract Agar* o *Sabouraud Dextrose Agar*, 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 o più settimane se necessario, 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*

Nella famiglia è incluso un ampio ed eterogeneo numero di bacilli Gram-negativi il cui habitat naturale è prevalentemente costituito dall'intestino dell'uomo e di altri animali, 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 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 *E. 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 sviluppano colonie verde-blu. La 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. Il 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. Da ricordare comunque che il 10% dei ceppi di *Staphylococcus aureus* non chiarifica il terreno.

– *Actinomiceti*

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 cicloeximide 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, 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 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 dopo incubazione a 37°C in termostato per 48 ore.

Per confermare che le colonie cresciute siano i microrganismi bersaglio 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 incubazione a 44°C per circa 2 ore le colonie degli enterococchi si presenteranno circondate da un alone nero sul substrato per precipitazione del ferro.

– *Pseudomonas spp*

Per la sua 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 le 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. Nel secondo substrato, 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* incubare secondo le istruzioni riportate dal produttore del terreno di coltura. Per la conferma delle colonie sospette di *Pseudomonas spp* è necessario eseguire almeno i test dell'ossidasi ed eventualmente dell'acetamide.

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

Ricerca di batteri patogeni

Data la particolarità della matrice aria, si può supporre che tutti i microrganismi *airborne* siano potenzialmente danneggiati proprio per il “passaggio di stato” che hanno subito. La ricerca dei patogeni e degli opportunisti 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 la possibilità di isolamento e crescita.

In ogni caso potrebbe essere di interesse allargare il campo delle indagini in questa direzione includendo la possibilità di verificare la presenza, ad esempio, delle salmonelle qualora la tipologia di ambiente, per essere caratterizzato, renda necessaria la ricerca di questo patogeno enterico. Infatti 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. Le salmonelle, essendo batteri asporigeni, non sono molto resistenti al calore; alcuni sierotipi hanno comunque una dose infettante relativamente bassa.

Salmonella spp

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, captando volumi di aria da un minimo di 1000 L a volumi maggiori che danno una maggior possibilità di isolamento. *Salmonella*, come patogeno, non deve essere presente negli ambienti *indoor*.

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

– *Prearricchimento*

La fase di prearricchimento prevede l'inoculo 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 (*Most Probable Number*, MPN) con incubazione per 24 ore a un massimo di 37°C, anche se, per altre matrici ambientali, viene eseguita a 42°C, temperatura che, in questo specifico caso, potrebbe essere troppo selettiva per *Salmonella*.

– *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 delle colonie è rosso-rosato con centro nero ad eccezione dei ceppi H₂S negativi.

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

Qualora si ritenga opportuno, si può procedere alla tipizzazione delle colonie mediante conferma sierologica. Gli stipiti selezionati in base alle caratteristiche colturali e biochimiche proprie di *Salmonella* possono essere tipizzati in base alla classificazione di Kauffmann-White utilizzando sieri polivalenti. L'ulteriore tipizzazione sierologica può essere effettuata con sieri monovalenti anti-O e anti-H oppure inviando gli stipiti ai centri di riferimento per la *Salmonella*. Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai testi specifici.

Ricerca dei funghi

Incubare direttamente il campione se raccolto con campionamento attivo ad impatto; qualora il prelievo sia stato effettuato mediante campionatori attivi equipaggiati di mezzo liquido (gorgogliatori), seminare per spatolamento aliquote note del mezzo di raccolta su terreno agarizzato specifico; seguire la stessa procedura nel caso di prelievi di superficie effettuati a tampone.

Nel caso di campionamenti attivi per filtrazione su membrane di gelatina, esse devono essere adagiate sul mezzo nutritivo agarizzato specifico e incubate alle temperature e tempi idonei, precedentemente descritti.

Dopo incubazione procedere all'enumerazione di tutte le colonie caratteristiche cresciute e, considerando il volume di aria campionata, l'aliquota del liquido di raccolta seminata (o una eventuale diluizione effettuata), riportare infine il valore ottenuto come numero di colonie per metro cubo di aria (N/m³) o per centimetro quadrato di superficie (N/cm²)

Qualora si volesse procedere all'osservazione microscopica degli organismi cresciuti, finalizzata all'identificazione, effettuare isolamenti delle colonie da saggiare.

La struttura filamentosa del micelio vegetativo dei funghi può essere nascosta da una copertura piumosa, cotonosa o polverulenta formata da miceli aerei e da spore disposte anche ad anelli concentrici sul terreno di crescita.

Diversamente, i lieviti sviluppano colonie dall'aspetto cremoso, a cupola, generalmente bianche nella prima fase di crescita e, dopo la formazione di blastoconidi, di colorazioni diverse.

Nel caso si sviluppino colonie di lieviti, effettuare gli isolamenti mediante ansa sterile prelevando materiale cellulare al centro della colonia da saggiare. Strisciare, quindi, su vetrino portaoggetti stemperando in una goccia di acqua distillata sterile. Osservare al microscopio, preferibilmente a contrasto di fase con ingrandimento 20x o 40x, per evidenziare lo pseudomicelio e le spore. Procedere, eventualmente, all'identificazione con prove biochimiche miniaturizzate disponibili in commercio.

Relativamente ai funghi, il loro riconoscimento deve considerare sia le caratteristiche morfologiche macroscopiche della colonia, quali aspetto, colore, forma e consistenza, che quelle microscopiche costituite dalla morfologia delle strutture riproduttive e dalla tipologia delle spore prodotte, nonché i tempi di sviluppo e crescita delle colonie stesse.

L'identificazione richiede tempi lunghi, oltre a una comprovata esperienza in materia; l'aspetto delle colonie varia, infatti, a seconda del substrato sul quale si sviluppano. Le colonie cresciute sui terreni utilizzati devono essere, pertanto, necessariamente processate mediante osservazione microscopica diretta, espletabile tramite la tecnica del nastro adesivo (*stripping*), utilizzando un colorante vitale che permette di evidenziare la struttura del tallo e dell'apparato fruttifero.

La tecnica in questione consiste nel fare aderire delicatamente una striscia di nastro adesivo trasparente alla superficie della colonia da esaminare; trasferire, quindi, il nastro con la parte adesiva rivolta verso il basso, su un vetrino portaoggetti sul quale è stata già posta una goccia di soluzione colorante costituita da blu di lattofenolo e coprire con un vetrino coprioggetti. Osservare, infine, al microscopio ottico con ingrandimento 100x a immersione e per l'identificazione tassonomica si rimanda ai testi specifici.

Una tecnica alternativa che permette di non raccogliere troppo materiale, principalmente le spore spesso presenti in gran quantità sulla superficie del micelio, prevede l'utilizzo di un'ansa ripiegata ad uncino o di un ago per insulina, sterilizzati sulla fiamma di un bunsen, che vengono inseriti nel terreno agarizzato che circonda il fungo per alzare una piccola zolla da deporre e colorare sul vetrino. Qualora col tassellino si prelevi un po' di agar, si può far sciogliere scaldando leggermente alla fiamma, ottenendo l'eliminazione dell'aria fra vetrino e coprioggetti. Il prelievo con l'ago consente di scegliere con precisione il punto del prelievo che dovrebbe essere, preferibilmente, la periferia della colonia fungina che, essendo meno matura, dovrebbe presentare meno spore.

Virus

Dopo la raccolta del campione (aria o superfici) per il rilevamento di virus, è necessario procedere per la verifica della presenza dell'agente virale.

La metodica più significativa a livello diagnostico è l'isolamento dei virus su opportune colture cellulari sensibili, 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 nelle cellule di un certo tessuto. Può rendersi manifesta con la comparsa di alterazioni cellulari (effetto citopatico) che si esprimono morfologicamente in fenomeni diversi nel tappeto cellulare (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 (33, 125).

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 e utilizzati con successo sistemi integrati di 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 quello dell'influenza (33, 125, 126), il rhinovirus (34), il virus respiratorio sinciziale (28, 56), il virus varicella-zoster (117) e il virus della SARS (48).

Allergeni

Le procedure di analisi degli allergeni presenti negli ambienti *indoor* consistono in diverse fasi, qui di seguito descritte:

– Estrazione

Dopo la raccolta del campione per l'analisi degli allergeni rilevabili nella polvere, la procedura di estrazione prevede, in primo luogo, che il campione di polvere venga setacciato mediante un setaccio a *mesh* n. 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 in base al seguente rapporto: 100 mg di polvere fine (dopo setacciatura) in 2 mL di *Phosphate Buffered Saline* (PBS) *Tween* 0,05%. Dopo aver aggiunto il volume di tampone nel rapporto appropriato è necessario agitare il tubo contenente il campione tramite un vortex. Successivamente, il 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. Il tubo andrà poi 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. 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. Se si vuole mettere a punto e convalidare tale metodica *in house*, il materiale di partenza necessario è 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 processo di 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 del 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 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 falsi risultati. Dopo un'ulteriore fase di lavaggio in ciascun pozzetto viene introdotto l'antigene (allergene) contenuto negli estratti di campioni di polvere. L'antigene, se presente negli estratti, si lega all'anticorpo specifico adsorbito. All'interno dei campioni di polvere possono essere presenti contemporaneamente tutti gli allergeni (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 e 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 e 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. Infatti, è importante avere dati riproducibili e il più possibile reali, per valutare la qualità dell'aria e stabilire le azioni correttive per limitare la 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 controlli positivi e controlli negativi. 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. È inoltre opportuno effettuare per ciascun campione da dosare almeno quattro o cinque diluizioni al raddoppio (ciascuna diluizione ripetuta in duplicato 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 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*. Inoltre, spesso in letteratura sono pubblicati dati discordanti e, talvolta, poco chiari; ad oggi ancora difficile è stabilire con certezza aspetti importanti quali, ad esempio, le soglie di rischio per l'esposizione agli allergeni. Gli ultimi e sostanzialmente unici valori ipotizzati sulle soglie di rischio risalgono al 1997 (19) e sono disponibili solo per pochi allergeni.

Endotossine batteriche

Per la determinazione di endotossine è possibile fare riferimento alla norma UNI EN 13098 del 2002.

La procedura prevede:

– *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 3-4 ore.

Per questo trattamento deve essere utilizzata una stufa qualificata, per la quale sia dimostrabile che temperatura e 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 (es. 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 (127-130).

Dopo l'estrazione dovrà essere misurato il pH, il cui valore dovrà essere compatibile con le prestazioni 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 aliquote multiple da destinarsi a successiva determinazione quantitativa delle endotossine mediante LAL test. Data la stabilità delle endotossine congelate, gli estratti possono essere conservati in tali condizioni anche per lunghi periodi di tempo. Lo stoccaggio in aliquote multiple si ritiene necessario per evitare che cicli di congelamento-scongelo possano diminuire la concentrazione di endotossina. Sono state riscontrate in quei casi, riduzioni del 25%.

Per 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 (131).

– *Determinazione*

La determinazione della concentrazione delle endotossine viene effettuata mediante il LAL test che utilizza il lisato di cellule del sangue, amebociti, del *Limulus polyphemus*; 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 (132) e adattata solo successivamente alla valutazione della concentrazione di endotossine in altre matrici, anche ambientali (133).

Dalla specie *Limulus polyphemus* viene prelevata l'emolinfa mediante una puntura intracardiaca che una volta effettuata permette il rilascio immediato dell'animale in mare senza danni. Il *Limulus* appartiene alla classe degli *Xiphosura*, artropodi chelicerati il cui primitivo sistema immunitario è 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 ($Cu^{++} \leftrightarrow Cu^+$). 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.

Sono stati osservati fenomeni di inibizione e/o attivazione da parte di peptidoglicani, altri componenti della parete batterica, e degli s-glucani di origine fungina 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 tecniche del test LAL disponibili: gel-clot, cromogenico e turbidimetrico.

Le tre tecniche differiscono nel tipo di risultato finale e nel valore di endotossina rilevabile: con il gel clot in presenza di endotossine nel campione si sviluppa un coagulo compatto, con la tecnica cromogenica viene emesso colore, mentre con quella turbidimetrica si sviluppa torbidità. La concentrazione di endotossina misurata viene sempre espressa come UE/mL 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 (*Reference Standard Endotoxin*, RSE). La RSE ha avuto inizialmente diverse denominazioni a seconda dei vari Enti di riferimento, ma dal gennaio 1998 la denominazione è stata uniformata ad *E. coli* EC-6.

Di seguito vengono descritte brevemente le tre distinte tecniche utilizzabili nel LAL test:

- Il gel clot è una tecnica qualitativa o semi-quantitativa 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 (134). 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 espresso come UE/m³.

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

- La tecnica cromogenica è quantitativa-cinetica o *end-point*; 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 (*Optical Density*, 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 della RSE. La tecnica consente di determinare concentrazioni di endotossina fino a 0,005 UE/mL.
- La tecnica turbidimetrica è quantitativa-cinetica. Il lisato sviluppa torbidità in presenza di endotossine; maggiore è la concentrazione di endotossina nel campione, più velocemente si sviluppa torbidità che viene letta come valore di densità ottica (OD). Con questa tecnica 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 della 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 della RSE. L'analisi turbidimetrica è molto rapida, semplice e soprattutto molto sensibile: è infatti possibile rilevare valori di endotossina fino a 0,001 UE/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.

Esprimendo le 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. È consigliabile, pertanto, non convertire i risultati di un LAL test espresso in UE/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 lo svolgimento di una routinaria prova di attivazione/inibizione sul campione, alla massima diluizione valida (132).

Tale prova prevede l'aggiunta di uno standard di endotossina di *Escherichia coli* (CSE) a diverse diluizioni del campione, in modo da avere 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 un controllo negativo (acqua apirogena) da effettuare in doppio, e un 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 prestazioni del LAL test.

BIBLIOGRAFIA

1. Fanger OP. What is IAQ? *Indoor Air* 2006;16:328-34.
2. Italia. Accordo del 27 settembre 2001 tra il Ministro della Salute, le Regioni e le Province Autonome sul documento concernente: "Linee-guida per la tutela e la promozione della salute negli ambienti confinati". *Gazzetta Ufficiale – Supplemento ordinario* n. 276 del 27 novembre 2001.
3. World Health Organization. *Guidelines for indoor air quality: selected pollutants*. Geneva: WHO; 2010. Disponibile all'indirizzo: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0009/128169/e94535.pdf; ultima consultazione 8/3/2013.
4. Künzli N, Oglesby L. *Air pollution exposure distributions of adult urban populations in Europe "EXPOLIS"*. Basel: Federal Office for Education and Sciences (BBW); 1997.
5. Bastone A, Soggiu ME, Vollono C, Viviano G, Masciocchi M, Rago G, Sellitri C, Spagnolo S, Spartera M. *Stili di vita e comportamenti delle popolazioni di Taranto, Massafra, Crispiano e Statte ai fini della valutazione dell'esposizione inalatoria ad inquinamento atmosferico*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2006. (Rapporti ISTISAN 06/36).
6. Jantunen M, Oliveira Fernandes E, Carrer P, Kephelopoulos S. *Promoting actions for healthy indoor air (IAIAQ)*. Luxembourg: European Commission Directorate General for Health and Consumers; 2011.
7. Sarigiannis DA, Karakitsios SP, Gotti A, Liakos IL, Katsoyiannis A. Exposure to major volatile organic compounds and carbonyls in European indoor environments and associated health risk. *Environmental International* 2011;37(4):743-65.
8. Wolkoff P. Volatile organic compounds sources, measurements, emissions, and the impact on indoor air quality. *Indoor Air* 1995;5(S3):5-73.
9. Pasquarella C, Albertini R, Dall'Aglio P, Saccani E, Sansebastiano GE, Signorelli C. Il campionamento microbiologico dell'aria: lo stato dell'arte. *Igiene e Sanità Pubblica* 2008;64:79-120.
10. Pasquarella C. I campionamenti ambientali: come farli. *Microbiologia medica* 2003;64(2):81-2.
11. Bonadonna L, Marconi A. *Stato attuale ed orientamento degli studi e delle ricerche sulla contaminazione biologica dell'aria degli ambienti chiusi (indoor)*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 1990. (Rapporti ISTISAN 90/14).
12. Srikanth P, Sudharsanam S, Steinberg R. Bio-aerosols in indoor environment: composition, health effects and analysis. *Ind Journ Med Microbiol* 2008;26(4):302-12.
13. Görný RL, Dutkiewicz J, Krysinska-Traczyk E. Size distribution of bacterial and fungal bioaerosols in indoor air. *Ann Agric Environ Med* 1999;6:105-13.
14. Pasquarella C, Saccani E, Sansebastiano GE, Ugolotti M, Pasquariello G, Albertini R. Proposal for a biological environmental monitoring approach to be used in libraries and archives. *Ann Agric Environ Med* 2012;19(2):209-12.
15. Health Protection Agency. *A children's environment and health strategy for the UK*. Didcot: HPA; 2009.
16. Istituto Nazionale per l'Assicurazione contro gli Infortuni sul lavoro. *Il campionamento microbiologico negli ambienti di lavoro. Campionamento e analisi. Edizione 2010*. Roma: INAIL 2010. Disponibile all'indirizzo: http://www.inail.it/internet_web/wcm/idc/groups/internet/documents/document/ucm_portstg_093159.pdf; ultima consultazione 10/2/2014.
17. Ferguson BJ. Environmental Controls of Allergies. *Otolaryngol Clin North Am* 2008;41:411-7.

18. Platts-Mills T, Leung DYM, Schatz M. The Role of allergens in asthma. *Am Fam Physician* 2007;76:675-80.
19. Platts-Mills TA, Vervloet D, Thomas WR, *et al.* Indoor allergen and asthma: report of the Third International Workshop. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:S2-24.
20. Arbes SJ, Cohn RD, Yin M, Muilenberg ML *et al.* Dog allergen (Can f1) and cat allergen (Fel d1) in US homes: results from the national survey of lead and allergen in housing. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114:111-7.
21. Brunetto B, Brescianini S, Barletta B, *et al.* Exposure to indoor allergens and association with allergy symptoms of employees in a work environment. *Ann Ist Super Sanita* 2009;45(4):415-22.
22. Brunetto B, Barletta B, Brescianini S, *et al.* Differences in the presence of allergens among several types of indoor environments. *Ann Ist Super Sanita* 2009;45(4):409-14.
23. Mondello F. *Funghi patogeni per l'uomo: generalità e prospettive*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2010. (Rapporti ISTISAN 08/10).
24. Verreault D, Moineau S, Duchaine C. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008;72(3):413-44.
25. Knight V. Viruses as agents of airborne contagion. *Ann N Y Acad Sci* 1980;353:147-56.
26. Couch RB. Viruses and indoor air pollution. *Bull N Y Acad Med* 1981;57(10):907-21.
27. Tellier R. Aerosol transmission of influenza A virus: a review of new studies. *J R Soc Interface* 2009;6(Suppl 6):S783-90.
28. Lindsley WG, Blachere FM, Davis KA, Pearce TA, Fisher MA, Khakoo R, *et al.* Distribution of airborne influenza virus and respiratory syncytial virus in an urgent care medical clinic. *Clin Infect Dis* 2010;50(5):693-8.
29. Lindsley WG, Pearce TA, Hudnall JB, Davis KA, Davis SM, Fisher MA, *et al.* Quantity and size distribution of cough-generated aerosol particles produced by influenza patients during and after illness. *J Occup Environ Hyg* 2012;9(7):443-9.
30. Salgado CD, Farr BM, Hall KK, Hayden FG. Influenza in the acute hospital setting. *Lancet Infect Dis* 2002;2(3):145-55.
31. Kim JH, Lee DH, Shin SS, Kang C, Kim JS, Jun BY, *et al.* In-flight transmission of novel influenza A (H1N1). *Epidemiol Health* 2010;32:e2010006.
32. Lee BY, Brown ST, Cooley P, Potter MA, Wheaton WD, Voorhees RE, *et al.* Simulating school closure strategies to mitigate an influenza epidemic. *J Public Health Manag Pract* 2010;16(3):252-61.
33. Goyal SM, Anantharaman S, Ramakrishnan MA, Sajja S, Kim SW, Stanley NJ, *et al.* Detection of viruses in used ventilation filters from two large public buildings. *Am J Infect Control* 2011;39(7):e30-e38.
34. Myatt TA, Johnston SL, Zuo Z, Wand M, Keadze T, Rudnick S, *et al.* Detection of airborne rhinovirus and its relation to outdoor air supply in office environments. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169(11):1187-90.
35. Huynh KN, Oliver BG, Stelzer S, Rawlinson WD, Tovey ER. A new method for sampling and detection of exhaled respiratory virus aerosols. *Clin Infect Dis* 2008;46(1):93-5.
36. Korves TM, Johnson D, Jones BW, Watson J, Wolk DM, Hwang GM. Detection of respiratory viruses on air filters from aircraft. *Lett Appl Microbiol* 2011;53(3):306-12.
37. Louie JK, Yagi S, Nelson FA, Kiang D, Glaser CA, Rosenberg J, *et al.* Rhinovirus outbreak in a long term care facility for elderly persons associated with unusually high mortality. *Clin Infect Dis* 2005;41(2):262-5.

38. Hicks LA, Shepard CW, Britz PH, Erdman DD, Fischer M, Flannery BL, *et al.* Two outbreaks of severe respiratory disease in nursing homes associated with rhinovirus. *J Am Geriatr Soc* 2006;54(2):284-9.
39. MacIntyre CR, Ridda I, Seale H, Gao Z, Ratnamohan VM, Donovan L, *et al.* Respiratory viruses transmission from children to adults within a household. *Vaccine* 2012;30(19):3009-14.
40. Couch RB, Douglas RG, Lindgren KM, Gerone PJ, Knight V. Airborne transmission of respiratory infection with coxsackievirus A type 21. *Am J Epidemiol* 1970;91(1):78-86.
41. Chang LY, Tsao KC, Hsia SH, Shih SR, Huang CG, Chan WK, *et al.* Transmission and clinical features of enterovirus 71 infections in household contacts in Taiwan. *JAMA* 2004;291(2):222-7.
42. Tseng CC, Chang LY, Li CS. Detection of airborne viruses in a pediatrics department measured using real-time qPCR coupled to an air-sampling filter method. *J Environ Health* 2010;73(4):22-8.
43. Rantakallio P, Lapinleimu K, Mantyjärvi R. Coxsackie B 5 outbreak in a newborn nursery with 17 cases of serous meningitis. *Scand J Infect Dis* 1970;2(1):17-23.
44. Akiyoshi K, Nakagawa N, Suga T. An outbreak of aseptic meningitis in a nursery school caused by echovirus type 30 in Kobe, Japan. *Jpn J Infect Dis* 2007;60(1):66-8.
45. Olsen SJ, Chang HL, Cheung TY, Tang AF, Fisk TL, Ooi SP, *et al.* Transmission of the severe acute respiratory syndrome on aircraft. *N Engl J Med* 2003;349(25):2416-22.
46. Radun D, Niedrig M, Ammon A, Stark K. SARS: retrospective cohort study among German guests of the Hotel 'M', Hong Kong. *Euro Surveill* 2003;8(12):228-30.
47. McKinney KR, Gong YY, Lewis TG. Environmental transmission of SARS at Amoy Gardens. *J Environ Health* 2006;68(9):26-30.
48. Booth TF, Kournikakis B, Bastien N, Ho J, Kobasa D, Stadnyk L, *et al.* Detection of airborne severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and environmental contamination in SARS outbreak units. *J Infect Dis* 2005;191(9):1472-7.
49. Potter RN, Cantrell JA, Mallak CT, Gaydos JC. Adenovirus-associated deaths in US military during postvaccination period, 1999-2010. *Emerg Infect Dis* 2012;18(3):507-9.
50. Ghanaïem H, Averbuch D, Koplewitz BZ, Yatsiv I, Braun J, Dehtyar N, *et al.* An outbreak of adenovirus type 7 in a residential facility for severely disabled children. *Pediatr Infect Dis J* 2011;30(11):948-52.
51. Brummitt CF, Cherrington JM, Katzenstein DA, Juni BA, Van Drunen N, Edelman C, *et al.* Nosocomial adenovirus infections: molecular epidemiology of an outbreak due to adenovirus 3a. *J Infect Dis* 1988;158(2):423-32.
52. Akiyoshi K, Suga T, Fukui K, Taniguchi K, Okabe N, Fujimoto T. Outbreak of epidemic keratoconjunctivitis caused by adenovirus type 54 in a nursery school in Kobe City, Japan in 2008. *Jpn J Infect Dis* 2011;64(4):353-5.
53. Macartney KK, Gorelick MH, Manning ML, Hodinka RL, Bell LM. Nosocomial respiratory syncytial virus infections: the cost-effectiveness and cost-benefit of infection control. *Pediatrics* 2000 Sep;106(3):520-6.
54. Utsumi M, Makimoto K, Quroshi N, Ashida N. Types of infectious outbreaks and their impact in elderly care facilities: a review of the literature. *Age Ageing* 2010;39(3):299-305.
55. Gravenstein S, Ambrozaitis A, Schilling M, Radzisauskiene D, Krause P, Drinka P, *et al.* Surveillance for respiratory illness in long-term care settings: detection of illness using a prospective research technique. *J Am Med Dir Assoc* 2000;1(3):122-8.
56. Aintablian N, Walpita P, Sawyer MH. Detection of *Bordetella pertussis* and respiratory syncytial virus in air samples from hospital rooms. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1998;19(12):918-23.

57. Nazaroff WW. Norovirus, gastroenteritis, and indoor environmental quality. *Indoor Air* 2011;21(5):353-6.
58. Repp KK, Keene WE. A point-source norovirus outbreak caused by exposure to fomites. *J Infect Dis* 2012;205(11):1639-41.
59. Dragagna R. Controllo delle endotossine batteriche nelle preparazioni parenterali. *Biologi Italiani* 2004;7:9-16.
60. Bouillard L, Michel O, Dramaix M, Devleeschouwer M. Bacterial contamination of indoor air, surfaces and settled dust and related dust endotoxin concentrations in healthy office buildings. *Ann Agric Environ Med* 2005;12(2):187-92.
61. Thorne PS, Kulha'nkova' K, Yin M, Cohn R, Arbes SJ, Zeldin DC. Endotoxin Exposure Is a Risk Factor for Asthma. The National Survey of Endotoxin in United States Housing. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:1371-7.
62. Anderson WB, Dixon DG, Mayfield CI. Estimation of endotoxin inhalation from shower and humidifier exposure reveals potential risk to human health. *Journal of Water and Health* 2007;5(4):553-72.
63. Gereda JE, Klinnert MD, Price MR, Leung DY, Liu AH. Metropolitan home living conditions associated with indoor endotoxin levels. *J Clin Immunol* 2001;107(5):790-6.
64. Associazione Farmaceutici Industria. *Buone pratiche di fabbricazione. Linee guida AFI. Volume IV.* Milano: Tecniche Nuove; 2007.
65. Hasday JD, Bascom R, Costa JJ, Fitzgerald T, Dubin W. Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke. *Chest* 1999;115:829-35.
66. Larsson L, Szponar B, Pehrson C. Tobacco smoking increases dramatically air concentrations of endotoxin. *Indoor Air* 2004;14(6):421-4.
67. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxin. *Scientific American* 1992;267:26-33.
68. Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: The story of endotoxin. *Nature Reviews Immunology* 2003;3:169-76.
69. Suffredini A, Fromm R, Parker M, Brenner M, Kovacs J, Wesley R, Parrillo J. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med* 1989;321(5):280-7.
70. Rietschel E, Holst O, Brade L, Muller-Loennies S, Mamat U, Zahringer U, Beckmann F. Bacterial endotoxin: chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;216:39-81.
71. Mullington J, Korth C, Hermann DM, Orth A, Galanos C, Holsboer F, Pollmächer T. Dose-dependent effects of endotoxin on human sleep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;278(4):R947-55.
72. Raison CL, Capuron L, Miller AH. Cytokine sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends in immunology* 2006;27:24-31.
73. Cunningham C, Champion S, Lunnon K, Murray CL, Woods JF, Deacon RM, Rawlins JN, Perry VH. Systemic inflammation induces acute behavioral and cognitive changes and accelerates neurodegenerative disease. *Biol Psychiatry* 2009;65(4):304-12.
74. Della Gioia N, Hannestad J. A critical review of Human endotoxin administration as an experimental paradigm of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 2010;34:130-43.
75. Grigoleit JS, Kullmann JS, Wolf OT, Hammes F, Wegner A, Jablönowski S, Engler H, Gizewski E, Oberbeck R, Schedlowski M. Dose-dependent effects of endotoxin on neurobehavioral Functions in Humans. *Plos ONE* 2011;6(12):1-10.

76. Marasas WFO, Nelson PE. *Mycotoxigenology: introduction to the mycology, plant pathology, chemistry, toxicology, and pathology of naturally occurring mycotoxicoses in animals and man*. University Park: Pennsylvania State University Press; 1987.
77. Croft WA, Jarvis BB, Yatavara CS. Airborne outbreak Trichothecene toxicosis. *Atmospheric Environment* 1986;20:549-552.
78. Johanning E, Morey PR, Jarvis BB. Clinical-epidemiological investigation of health effects caused by *Stachybotrys atra* building contamination. In: *Indoor Air 1993. Proceedings of the Sixth International Conference on Indoor Air Quality and Climate, Health Effects*; Helsinki, Helsinki (Finlandia), luglio 4-8, 1993. p. 90-2.
79. Griffin DH (Ed.). *Fungal physiology*. New York: Wiley – Liss; 1993.
80. Samson RA. Mycotoxins: a mycologist's perspective. *J Med Vet Mycol* 1992;30 Suppl 1:9-18.
81. Schiefer HB. Mycotoxins in indoor air: a critical toxicological viewpoint. In: *Indoor Air '90. Proceedings of the Fifth International Conference on Indoor Air Quality and Climate*; Toronto (Canada), luglio 29-agosto 3, 1990. p. 167-72.
82. Hurst CJ, Knudsen GR, Mcinerney MJ, Stetzenbach LD, Walter MV. *Manual of environmental microbiology*. Washington DC: ASM Press: 1997.
83. Sorenson WG, Frazier DG, Jarvis BB, Simpson J, Robinson VA. Trichothecene mycotoxins in aerosolized conidia of *Stachybotrys atra*. *Appl Environ Microbiol* 1987;53(6):1370-1375.
84. Rylander R. The role of endotoxin for reaction after exposure to cotton dust. *Am J Ind Med* 1987;12(6):687-97.
85. Flaherty DK, Deck FH, Cooper J, Bioshop K, Wintenburger PA, Smith LX, Bynum L, Witmer WB. Bacterial endotoxin isolated from a water spray air humidification system as putative agent of occupation-related disease. *Infect Immun* 1984;43(1):206-12.
86. Macher J (Ed.). *Bioaerosols assessment and control*. Cincinnati, (Ohio): American Conference of Governmental Industrial Hygienists; 1999.
87. ECA-IAQ (European Collaborative Action "Indoor Air Quality and its Impact on Man"). *Biological particles in indoor environments*. Brussels: Commission of the European Community; 1993. (Report No. 12).
88. BS EN ISO 14644-6. *Cleanrooms and associated controlled environments. Vocabulary*. London: British Standard; 2007.
89. Dacarro C, Grignani E, Lodola L, Grisoli P, Cottica D. Proposta di indici microbiologici per la valutazione della qualità dell'aria degli edifici. *G It Med Lav Erg* 2000;22(3):229-35.
90. Europa. Direttiva 1993/88/CEE 12 ottobre 1993 che modifica la direttiva 90/679/CEE relativa alla protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti biologici durante il lavoro (settima direttiva particolare ai sensi dell'articolo 16, paragrafo 1 della direttiva 89/391/CEE). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 268, 29 ottobre 1993.
91. Tseng CC, Li CS. Collection efficiencies of aerosol samplers for virus-containing aerosols. *J Aerosol Sci* 2005;36(5-6):593-607.
92. Salgado CD, Farr BM, Hall KK, Hayden FG. Influenza in the acute hospital setting. *Lancet Infect Dis* 2002;2(3):145-55.
93. Frankel M, Timm M, Hansen EW, Madsen AM. Comparison of sampling methods for the assessment of indoor microbial exposure. *Indoor Air* 2012;22:405-14.
94. Booth TF, Kournikakis B, Bastien N, Ho J, Kobasa D, Stadnyk L, et al. Detection of airborne severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and environmental contamination in SARS outbreak units. *J Infect Dis* 2005;191(9):1472-7.

95. Pasquarella C, Albertini R, Dall'Aglio P, Saccani E, Sansebastiano GE, Signorelli C. Il campionamento microbiologico dell'aria: lo stato dell'arte. *Ig Sanità Pubbl* 2008;64:79-120.
96. Istituto Nazionale per l'Assicurazione contro gli Infortuni sul lavoro. *Il rischio biologico negli ambulatori "Prime Cure" INAIL Proposta di valutazione attraverso una metodologia integrata*. Roma: INAIL; 2013. Disponibile all'indirizzo: http://www.inail.it/internet_web/wcm/idc/groups/internet/documents/document/ucm_113872.pdf; ultima consultazione 10/2/2014.
97. Burton NC, Grinshpun SA, Reponen T. Physical collection efficiency of filter materials for bacteria and viruses. *Ann Occup Hyg* 2007;51(2):143-51.
98. Dart A, Thornburg J. Collection efficiencies of bioaerosol impingers for virus-containing aerosols. *Atmos Environ* 2008;42:828-32.
99. Verhoeff AP, Van Wijnen JH, Brunekreef B, Fischer P, Van Reenen-Hoekstra ES, Samson RA. Presence of viable mould propagules in indoor air in relation to house damp and outdoor air. *Allergy* 1992;47:83-91.
100. Verreault D, Moineau S, Duchaine C. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008;72(3):413-44.
101. Hermann JR, Zimmerman JJ. Analytical sensitivity of air samplers based on uniform point-source exposure to airborne porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine influenza virus. *Can J Vet Res* 2008;72(5):440-3.
102. Happ JW, Harstad JB, Buchanan LM. Effect of air ions on submicron t1 bacteriophage aerosols. *Appl Microbiol* 1966;14(6):888-91.
103. Liu K, Wen Z, Li N, Yang W, Wang J, Hu L, *et al*. Impact of relative humidity and collection media on mycobacteriophage D29 aerosol. *Appl Environ Microbiol* 2012;78(5):1466-72.
104. Trincado C, Dee S, Jacobson L, Otake S, Pijoan C. Evaluation of an all-glass impinger for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in natural and artificial aerosols. *Vet Rec* 2006;158(6):206-8.
105. Hogan CJ Jr, Kettleson EM, Lee MH, Ramaswami B, Angenent LT, Biswas P. Sampling methodologies and dosage assessment techniques for submicrometre and ultrafine virus aerosol particles. *J Appl Microbiol* 2005;99(6):1422-34.
106. Karim YG, Ijaz MK, Sattar SA, Johnson-Lussenburg CM. Effect of relative humidity on the airborne survival of rhinovirus-14. *Can J Microbiol* 1985;31(11):1058-61.
107. Ijaz MK, Sattar SA, Johnson-Lussenburg CM, Springthorpe VS, Nair RC. Effect of relative humidity, atmospheric temperature, and suspending medium on the airborne survival of human rotavirus. *Can J Microbiol* 1985 Aug;31(8):681-5.
108. Sattar SA, Ijaz MK, Johnson-Lussenburg CM, Springthorpe VS. Effect of relative humidity on the airborne survival of rotavirus SA11. *Appl Environ Microbiol* 1984;47(4):879-81.
109. Willeke K, Lin X, Grinshpun SA. Improved aerosol collection by combined impaction and centrifugal motion. *Aerosol Sci Tech* 1998;28:439-456.
110. Riemenschneider L, Woo MH, Wu CY, Lundgren D, Wander J, Lee JH, *et al*. Characterization of reaerosolization from impingers in an effort to improve airborne virus sampling. *J Appl Microbiol* 2010;108(1):315-24.
111. Cao G, Noti JD, Blachere FM, Lindsley WG, Beezhold DH. Development of an improved methodology to detect infectious airborne influenza virus using the NIOSH bioaerosol sampler. *J Environ Monit* 2011;13(12):3321-8.
112. Lindsley WG, Blachere FM, Thewlis RE, Vishnu A, Davis KA, Cao G, *et al*. Measurements of airborne influenza virus in aerosol particles from human coughs. *PLoS One* 2010;5(11):e15100.

113. Fabian P, McDevitt JJ, Houseman EA, Milton DK. Airborne influenza virus detection with four aerosol samplers using molecular and infectivity assays: considerations for a new infectious virus aerosol sampler. *Indoor Air* 2009;19(5):433-41.
114. Carducci A, Tozzi E, Rubulotta E, Casini B, Cantiani L, Muscillo M, *et al.* Assessing airborne biological hazard from urban wastewater treatment. *Water Research* 2000;34(4):1173-8.
115. Ziros PG, Kokkinos PA, Legaki E, Vantarakis A. Development of an optimized method for the detection of airborne viruses with real-time PCR analysis. *Virology* 2011;8:369.
116. Carducci A, Zucchini A, Vigetti M, Cantiani L, Pacini R. Analisi virologica dei fanghi derivanti da un impianto di depurazione a fanghi attivi. *Rivista Italiana d'Igiene* 1997;57(12):40-50.
117. Sawyer MH, Chamberlin CJ, Wu YN, Aintablian N, Wallace MR. Detection of varicella-zoster virus DNA in air samples from hospital rooms. *J Infect Dis* 1994;169(1):91-4.
118. Myatt TA, Johnston SL, Rudnick S, Milton DK. Airborne rhinovirus detection and effect of ultraviolet irradiation on detection by a semi-nested RT-PCR assay. *BMC Public Health* 2003;3:5.
119. Burton NC, Grinshpun SA, Reponen T. Physical collection efficiency of filter materials for bacteria and viruses. *Ann Occup Hyg* 2007;51(2):143-51.
120. McCluskey R, Sandin R, Greene J. Detection of airborne cytomegalovirus in hospital rooms of immunocompromised patients. *J Virol Methods* 1996;56(1):115-8.
121. Tseng CC, Li CS. Collection efficiencies of aerosol samplers for virus-containing aerosols. *J Aerosol Sci* 2005;5-6:593-607.
122. Ariano R, Bonifazi F. *Aerobiologia ed Allergeni stagionali. Il campionamento aerobiologico applicato alla pratica clinica*. Genova: Editore ECIG, 2006.
123. Julian TR, Tamayo FJ, Leckie JO, Boehm AB. Comparison of surface sampling methods for virus recovery from fomites. *Appl Environ Microbiol* 2011;77(19):6918-25.
124. Nusca A, Bonadonna L, Orefice L. Diffusione di agenti biologici nell'aria di ambienti confinati e patologie correlate. *Ig Sanità Pubbl* 2003;59(3):175-86.
125. Blachere FM, Lindsley WG, Pearce TA, Anderson SE, Fisher M, Khakoo R, *et al.* Measurement of airborne influenza virus in a hospital emergency department. *Clin Infect Dis* 2009;48(4):438-40.
126. Noti JD, Lindsley WG, Blachere FM, Cao G, Kashon ML, Thewlis RE, *et al.* Detection of infectious influenza virus in cough aerosols generated in a simulated patient examination room. *Clin Infect Dis* 2012 Jun;54(11):1569-77.
127. Douwes J, Versloot P, Hollander A, Heederik D, Doekes G. Influence of various dust sampling and extraction methods on the measurement of airborne endotoxin. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:1763-9.
128. Noss I, Doekes G, Sander I, Heederik DJ, Thorne PS, Wouters IM. Passive airborne dust sampling with the electrostatic dustfall collector: optimization of storage and extraction procedures for endotoxin and glucan measurement. *Ann Occup Hyg* 2010;54:651-8.
129. Spaan S, Heederik DJ, Thorne PS, Wouters IM. Optimization of airborne endotoxin exposure assessment: effects of filter type, transport conditions, extraction solutions, and storage of samples and extracts. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(19):6134-43.
130. Spaan S, Doekes G, Heederik D, Thorne PS, Wouters IM. Effect of extraction and assay media on analysis of airborne endotoxin. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:3804-11.
131. Novitsky TJ, Schmidt-Gegembach J, Remillard JF. Factors affecting recovery of endotoxin adsorbed to container surfaces. *J Parent Sci Technol* 1986;40(6):284-6.
132. Council of Europe. *Bacterial endotoxins. European Pharmacopoeia 5.0* (chapter 2.6.14) Method D. Strasbourg (France); 2005. p. 161-8.

133. Food and Drug Administration. *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; 1987.
134. United States Pharmacopeia. *Bacterial endotoxins test. The National Formulary USP 23rd revision. 18th edition*. Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 1995. p. 1696-7.

Norme nazionali e internazionali sulla contaminazione biologica *indoor*

- Allergic rhinitis and its impact on asthma. ARIA Workshop report. *J All Clin Immunol* 2001;108(5) Suppl. Disponibile all'indirizzo: http://www.progetto-aria.it/materiale/aria_jaci.pdf. ultima consultazione 10/2/2014.
- Global Initiative for Asthma. *Pocket guide for asthma management and prevention*. GINA; 2012. Disponibile all'indirizzo: http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Pocket2013_May15.pdf; ultima consultazione 10/2/2014.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). ICH harmonized tripartite guideline*. 1994. Disponibile all'indirizzo: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf; ultima consultazione 10/2/2014.
- ISO 18593:2004. *Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs*. Geneva: International Standard Organization; 2004.
- Italia. Documento 4 aprile 2000. Linee guida per la prevenzione e il controllo della legionellosi. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 103, 5 maggio 2000.
- Italia. Provvedimento 13 gennaio 2005. Accordo, ai sensi dell'articolo 4 del decreto legislativo 28 agosto 1997, n. 281, tra il Ministero della salute e i presidenti delle regioni e delle province autonome, avente ad oggetto Linee guida recanti indicazioni ai laboratori con attività di diagnosi microbiologica e controllo ambientale della legionellosi. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 29, 5 febbraio 2005.
- Italia. Provvedimento 13 gennaio 2005. Accordo, ai sensi dell'articolo 4 del decreto legislativo 28 agosto 1997, n. 281, tra il Ministro della salute e le regioni e le province autonome di Trento e di Bolzano, avente ad oggetto Linee guida recanti indicazioni sulla legionellosi per i gestori di strutture turistico-ricettive e termali. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 28, 4 febbraio 2005.
- National Asthma Education and Prevention Program. *Expert Panel Report 3: Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. Full Report 2007*. US Department of Health and Human Services, National Heart, Lung, and Blood Institute; 2007. (NIH Publication No. 07-4051). Disponibile all'indirizzo: <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/asthma/asthgdln.pdf>. ultima consultazione 10/2/2014.
- UNI 11108/2004. *Qualità dell'aria - Metodo di campionamento e conteggio dei granuli pollinici e delle spore fungine aerodisperse*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2004.
- UNI CEN/TS 16115-1:2011. *Qualità dell'aria ambiente - Misurazione di bioaerosol - Parte 1: Determinazione di muffe utilizzando sistemi di campionamento di filtrazione e coltivazione*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2011.
- UNI EN 13098:2002. *Atmosfera nell'ambiente di lavoro - Linee guida per la misurazione di microrganismi e di endotossine aerodispersi*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2002.

- UNI EN 14031:2005. *Atmosfere nell'ambiente di lavoro - Determinazione di endotossine in sospensione nell'aria*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2005.
- UNI EN ISO 14698-1:2004. *Camere bianche ed ambienti associati controllati - Controllo della biocontaminazione - Parte 1: Principi generali e metodi*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2004.
- UNI EN ISO 14698-2:2004. *Camere bianche ed ambienti associati controllati - Controllo della biocontaminazione - Parte 2: Valutazione e interpretazione dei dati di biocontaminazione*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2004.
- UNI EN ISO 7218:2007. *Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Requisiti generali e guida per le analisi microbiologiche*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2007

*Stampato da Ugo Quintily SpA
Viale Enrico Ortolani 149/151, 00125 Roma*

Roma, ottobre-dicembre 2013 (n. 4) 23° Suppl.