

LA CONTAMINAZIONE MICROBIOLOGICA DELLE SUPERFICI NEGLI AMBIENTI LAVORATIVI

INAIL

2017

Pubblicazione realizzata da

Inail

Consulenza tecnica accertamento rischi e prevenzione (Contarp)

a cura di

Raffaella Giovinazzo¹

autori

Simona Barca², Luigi Caradonna³, Genoveffa Giaquinta⁴, Raffaella Giovinazzo¹, Elena Guerrera⁵, Marina Mameli⁶, Antonella Mansi¹⁰, Gabriella Marena⁷, Teresa Mastromartino⁸, Daniela Sarto⁹, Paola Tomao¹⁰

collaborazioni

Annalaura Carducci¹¹, Marco Verani¹¹, Anna Molinari¹², Eleonora Masala¹²

- ¹ Contarp Centrale
- ² Contarp, Direzione regionale Lazio
- ³ Contarp, Direzione regionale Puglia
- ⁴ Contarp, Direzione regionale Sicilia
- ⁵ Contarp, Direzione regionale Umbria
- ⁶ Contarp, Direzione regionale Toscana
- ⁷ Contarp, Direzione regionale Lombardia
- ⁸ Contarp, Direzione regionale Basilicata
- ⁹ Contarp, Direzione regionale Liguria
- ¹⁰ Dimeila (*Dipartimento di medicina, epidemiologia, igiene del lavoro e ambientale*)
- ¹¹ Laboratorio di Igiene e Virologia Ambientale dell'Università di Pisa
- ¹² Laboratorio di Prevenzione dell'Agenzia della Tutela della Salute della Brianza

per informazioni

Inail - Consulenza tecnica accertamento rischi e prevenzione

Via Roberto Ferruzzi, 40 | 00143 Roma

contarp@inail.it

www.inail.it

© 2017 Inail

ISBN 978-88-7484-553-8

Gli autori hanno la piena responsabilità delle opinioni espresse nella pubblicazione, che non vanno intese come posizioni ufficiali dell'Inail. Distribuita gratuitamente. Vietata la vendita e la riproduzione con qualsiasi mezzo. È consentita solo la citazione con l'indicazione della fonte.

Tipolitografia Inail - Milano, maggio 2017

Il volume si colloca sulla scia di una serie di pubblicazioni in tema di rischio biologico, edite da Inail, frutto di studi e attività sperimentali condotte nel tempo dalla Consulenza Tecnica Accertamento Rischi e Prevenzione (Contarp). L'obiettivo è individuare criteri ed elaborare strumenti operativi utili alla valutazione del rischio di esposizione ad agenti biologici negli ambienti di lavoro, includendo in essa lo svolgimento di indagini sul campo e di laboratorio e i requisiti prestazionali del personale tecnico adibito alle analisi microbiologiche.

La gestione dei rischi di esposizione ad agenti biologici prevede, a carico del datore di lavoro, gli adempimenti specifici affrontati nei Titoli X e X-bis del d.lgs. 81/2008 e s.m.i. Più in generale, tuttavia, occorre ricordare anche l'obbligo di assicurare, nei luoghi di lavoro, condizioni igieniche adeguate (art. 64; Allegato IV, p.to 1.3).

Il controllo ambientale dei livelli di contaminazione microbiologica è utile per conoscere le concentrazioni dei microrganismi presenti, escludere la presenza di eventuali patogeni e valutare l'efficacia delle misure adottate per il contenimento del rischio. L'attenzione è rivolta, in particolare, al controllo dello stato igienico dei due principali veicoli di contaminazione microbiologica, cioè l'aria e le superfici con cui i lavoratori sono in contatto nello svolgimento delle loro attività.

Il presente volume focalizza l'attenzione sulle superfici, presentando lo stato dell'arte in materia.

Esso è frutto di una collaborazione tra Contarp e Dipartimento di Medicina, Epidemiologia, Igiene del Lavoro e Ambientale (Dimeila). La trattazione della tematica è arricchita anche da due contributi esterni - da parte, rispettivamente, del Laboratorio di Igiene e Virologia Ambientale dell'Università di Pisa e del Laboratorio di Prevenzione dell'Agenzia della Tutela della Salute (Ats) della Brianza - che affrontano aspetti specifici, quali il ruolo dei virus nella contaminazione delle superfici e la valutazione della contaminazione microbiologica nell'esperienza di un Organismo di vigilanza in materia di salute e sicurezza sul lavoro.

I contenuti del volume consentono di trarre indicazioni utili per progettare e realizzare un sistema di autocontrollo aziendale delle condizioni igieniche ambientali, con particolare riferimento alle superfici di interesse ai fini della gestione del rischio biologico.

Il Coordinatore generale Contarp
Fabrizio Benedetti

A Simona Barca,
professionista biologo della Contarp,
nostra collega e amica.

Indice

1. Premessa	7
2. La contaminazione microbiologica delle superfici negli ambienti lavorativi	9
Ambienti "sanitari"	9
Ambienti "non sanitari"	13
3. Aspetti normativi	17
La normativa in materia di salute e sicurezza sul lavoro	17
Normazione tecnica e linee di indirizzo	17
4. Panoramica sulle principali tecniche di campionamento ed analisi	27
5. Virus e ambienti di lavoro	41
6. Valori di riferimento relativi alla contaminazione microbica delle superfici	49
7. La sanificazione e disinfezione delle superfici	65
I disinfettanti	66
Disinfezione in campo alimentare	74
Disinfezione in ambiente sanitario	75
Classificazione degli strumenti in ambito sanitario ai fini della disinfezione	75

8. Il controllo della contaminazione microbiologica su superfici di ambienti di lavoro nell'esperienza del laboratorio di prevenzione dell'ATS della Brianza	77
9. Conclusioni	85
10. Allegati	89
a) Vie di trasmissione degli agenti infettivi	89
b) Attività dei disinfettanti	91
c) Disinfettanti per superfici ambientali semicritiche (a) o scarsamente critiche (b)	94
d) Classificazione CLP dei principi attivi dei disinfettanti	95
11. Glossario	97
12. Bibliografia	101

1. Premessa

La valutazione del rischio di esposizione dei lavoratori ad agenti biologici costituisce un preciso adempimento di legge per il datore di lavoro (d.lgs. 81/2008 e s.m.i.). Nelle indagini ambientali finalizzate alla valutazione dell'esposizione per via inalatoria o per contatto, il monitoraggio della contaminazione microbiologica aerodispersa e/o depositata sulle superfici rappresenta un percorso obbligato per controllare lo stato igienico generale e verificare la salubrità ambientale. Infatti, l'aria e le superfici di attrezzature, piani, apparecchiature e indumenti di lavoro, così come delle mani dei lavoratori possono rappresentare importanti veicoli di contaminazione microbiologica e potenziali fonti di trasmissione di agenti infettivi. L'attenzione è focalizzata sulla misura delle concentrazioni batteriche e fungine totali e sul rilevamento di indicatori microbici specifici e di patogeni, correlati allo svolgimento dell'attività di lavoro in esame. L'indisponibilità, per i biocontaminanti, di valori limite ufficiali che definiscano la soglia di rischio o di salubrità ambientale rende difficoltosa la valutazione dei risultati delle misure quantitative. Tuttavia, nel caso di attività con esposizione potenziale o accidentale ad agenti biologici, conoscere i livelli e la tipologia di contaminanti presenti e la loro variazione temporale e spaziale consente di rilevare la presenza di eventuali fonti di contaminazione o di amplificazione microbica, intervenendo tempestivamente con adeguate misure di prevenzione o di contenimento.

La contaminazione microbiologica delle superfici può avvenire per contatto con altre superfici contaminate (oggetti, utensili, mani del lavoratore ecc.) e per sedimentazione. È nota la correlazione esistente tra aerodispersione e sedimentazione gravitazionale dei biocontaminanti e i fattori in grado di influire su di essa (dimensioni e densità delle particelle sospese nell'aria, livelli di umidità, ventilazione ambientale ecc.). Maggiore è la contaminazione dell'aria, maggiore sarà il numero dei microrganismi che sedimentano per gravità. Il monitoraggio microbiologico delle superfici viene, pertanto, condotto anche per determinare il *fall out* microbico su aree o punti critici ai fini dell'esposizione. L'esperienza di laboratorio dimostra come la contaminazione si distribuisca sulle superfici in modo disomogeneo, rendendo spesso assai difficile il calcolo rigoroso dei livelli medi di concentrazione microbica. In tal caso, come evincere informazioni utili alla conoscenza del fenomeno, nel caso in cui misure ripetute sulla stessa superficie diano risultati altamente disomogenei tra di loro?

Quale è lo stato dell'arte in tema di monitoraggio microbiologico delle superfici? È possibile evincere dai dati di letteratura e dai documenti tecnici reperibili sull'argomento indicazioni operative, indici e/o criteri per la valutazione dello stato igienico, applicabili trasversalmente nei diversi contesti di lavoro?

Questo volume raccoglie lo stato dell'arte sulla tematica "contaminazione microbiologica su superfici di ambienti di lavoro", con l'intento di rispondere ai quesiti sopra esposti alla luce dell'esperienza sul campo maturata dagli Autori ed avvalendosi anche del contributo del Laboratorio di Prevenzione dell'Agenzia della Tutela della Salute (ATS) della Brianza e del Laboratorio di Igiene e Virologia Ambientale del Dipartimento di Biologia dell'Università di Pisa. In particolare, nel Capitolo 4, attraverso l'analisi di documenti tecnici e pubblicazioni scientifiche nazionali e internazionali reperibili anche in rete sull'argomento, viene presentata una panoramica sulle procedure e sulle tecniche di misura della contaminazione delle superfici, i parametri microbiologici più frequentemente rilevati e il loro significato igienistico-sanitario in diversi settori lavorativi, nonché i livelli di concentrazione cui eventualmente riferirsi per la valutazione dei risultati delle misure (Capitolo 6). È presente anche un'intera sezione dedicata agli studi epidemiologici e agli aspetti normativi (Capitoli 2 e 3) così come alla sanificazione (Capitolo 7), quale misura di controllo della contaminazione microbiologica. Una trattazione a parte è stata dedicata alla contaminazione delle superfici da parte dei virus (Capitolo 5).

La ricerca documentale in rete è stata condotta utilizzando principalmente le seguenti parole chiave: "contaminazione (micro) biologica delle superfici", "campionamento su superfici", "contaminazione di superfici", "contaminazione su superfici ospedaliere", "inquinamento microbiologico su superfici di *indoor*" [e le corrispondenti *keywords*: *surface, (micro) biological contamination, surface sampling, surface contamination, hospital surface contamination, indoor surface microbiological pollution*].

Sono stati considerati articoli in lingua italiana, inglese e francese a partire dal 1975, inclusi quelli riguardanti le superfici tessili degli indumenti di lavoro e dei DPI.

2. La contaminazione microbiologica delle superfici negli ambienti lavorativi

Ambienti "sanitari"

Dai dati di letteratura relativi alla diffusione di agenti infettivi responsabili di patologie a carico di pazienti e operatori sanitari, si evince che le superfici hanno un ruolo preminente nella diffusione dei microrganismi in ambito nosocomiale. La presenza di agenti biologici sulle superfici di attrezzature, arredi, oggetti, ecc. può rappresentare un rischio per pazienti e operatori e alcune ricerche (Otter *et al.*, 2013) hanno dimostrato quanto bassa sia la dose infettante di alcuni patogeni diffusi in ambito nosocomiale (spore di *Clostridium difficile*, Norovirus, ecc.). Relativamente alla contaminazione delle superfici, molti lavori scientifici sono incentrati sugli ambienti ospedalieri dove la problematica della contaminazione microbiologica delle superfici e delle attrezzature è particolarmente sentita. Spaulding nel 1968 distinse tre tipologie di superfici ambientali (critiche, semicritiche e non critiche) in ambito nosocomiale, ai fini dell'individuazione dei requisiti di pulizia o di sterilità delle stesse in funzione del loro impiego (assistenza, diagnosi e terapia) e, dunque, dell'entità del rischio di infezione (CDC, 2008). Negli ultimi dieci anni, il ruolo dell'ambiente nella trasmissione di microrganismi multi-resistenti negli ospedali è diventato sempre più importante a seguito di un aumento dell'incidenza delle infezioni nosocomiali. Le infezioni ospedaliere insorgono durante il ricovero in ospedale o in alcuni casi dopo che il paziente è stato dimesso, non essendo le stesse presenti al momento del ricovero. Il Comitato per la lotta contro le Infezioni Ospedaliere (istituito presso ogni presidio ospedaliero a seguito della circolare del Ministero della sanità n. 52/85 e del d.m. del 13 settembre 1988 «Determinazione degli standard del personale ospedaliero» - art. 2) ha il compito specifico di prevenire e controllare queste infezioni, garantendo la qualità dell'assistenza sanitaria fornita. Numerosi studi di settore hanno sottolineato il ruolo dell'ambiente inanimato nell'epidemiologia delle infezioni causate da agenti patogeni quali *Staphylococcus aureus* meticillina resistente (MRSA), *Enterococcus* spp. vancomicina resistenti (VRE), *Clostridium difficile*, *Acinetobacter* spp. e norovirus. Questi microrganismi sono in grado di sopravvivere nell'ambiente per ore o giorni (e in alcuni casi per mesi), contaminando superfici non critiche di arredi, attrezzature, oggetti, ecc. (Dancer, 2009). Nonostante la trasmissione di agenti patogeni da un paziente infetto a un altro si verifichi frequentemente attraverso le mani del personale sanitario, anche le superfici contaminate, le attrezzature mediche e le matrici ambientali come l'acqua e l'aria possono essere direttamente o indirettamente coinvolte nel meccanismo di trasmissione.

La contaminazione microbiologica delle superfici negli ambienti lavorativi

Il ruolo svolto dalle superfici nella trasmissione di patogeni a pazienti è stato confermato in base a:

- 1) rilievo della presenza di agenti patogeni responsabili di infezioni nosocomiali sulle superfici ambientali della stanza di degenza dei pazienti infettati;
- 2) riscontro che la pulizia e la disinfezione delle superfici sanitarie riducono l'incidenza delle infezioni nosocomiali;
- 3) altre evidenze che dimostrano il ruolo della contaminazione delle superfici ambientali nella trasmissione degli agenti infettivi negli ambienti sanitari (Tabella 1).

Tabella 1 - Evidenze che supportano il ruolo della contaminazione delle superfici nella trasmissione di patogeni associati agli ambienti sanitari

Caratteristiche	norovirus	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Acinetobacter spp.</i>
Abilità alla sopravvivenza per lunghi periodi nell'ambiente	SI	SI	SI
Contaminazione ambientale trovata frequentemente nelle stanze di pazienti infetti	SI	SI	SI
Il serbatoio ambientale contaminato costituisce la sorgente dei focolai epidemici	-	SI	SI
Una documentata contaminazione delle mani negli addetti alla sanità	-	SI	SI
Studi sull'uomo dimostrano che le mani contaminate di addetti ai servizi sanitari possono essere veicolo di trasmissione di patogeni	SI	-	SI
I livelli di contaminazione correlano con la frequenza della contaminazione delle mani degli operatori sanitari	-	SI	-
Prevalenza della contaminazione ambientale associata con l'infezione/contaminazione dei pazienti	-	SI	-
Degenza in una stanza precedentemente occupata da un paziente infetto associata con rischio di colonizzazione/infezione	-	SI	-
Efficace pulizia associata con una diminuzione dell'incidenza delle infezioni ospedaliere	-	SI	SI

Fonte: Weber *et al.*, 2010

Nonostante la principale fonte di patogeni nosocomiali sia rappresentata dalla flora endogena del paziente, il 20% - 40% delle infezioni ospedaliere è stato attribuito a infezioni trasmesse attraverso mani e/o guanti del personale sanitario contaminate dal contatto diretto con il paziente o con superfici ambientali. In uno studio svolto in un ospedale messicano sono stati isolati da superfici ambientali diversi batteri appartenenti al genere *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *E. coli* e funghi appartenenti ai generi *Cla- dosporium*, *Microsporum*, *Aspergillus*, *Penicillium*. La presenza di questi microrganismi è stata rilevata su tavoli, attrezzature di lavoro e mani dello staff medico. Gli autori sottolineano che il livello di contaminazione ambientale si riduceva notevolmente dopo un lavaggio accurato delle mani degli operatori prima e dopo il contatto con i pazienti e con le superfici, pratica questa che risultava essere disattesa in più del 50% dei reparti esaminati (Garzia-Cruz, 2012 a).

Carducci *et al.* (2011) hanno monitorato vari reparti dell'Ospedale Universitario di Pisa, sulle cui superfici sono stati riscontrati batteri e virus (per approfondimenti, vedi Capitolo 5). La contaminazione batterica è risultata essere inferiore a 1 UFC/cm², mentre il 19% delle superfici ospedaliere testate sono risultate contaminate da acidi nucleici virali (rotavirus, adenovirus e norovirus).

Il grado di pulizia di 820 superfici in 210 stanze ospedaliere è stato valutato a intervalli regolari mediante la tecnica dell'ATP bioluminescenza (Branch-Elliman *et al.*, 2014). Questo studio ha evidenziato una diminuzione significativa della contaminazione delle superfici ospedaliere a seguito della sanificazione. Un altro studio ha invece campionato 113 superfici di una sala operatoria e reparti ospedalieri: nel 70-76% dei casi, dopo le normali operazioni di pulizia, il livello di contaminazione microbica non risultava accettabile. I siti maggiormente contaminati erano quelli delle cucine e nei bagni, aree normalmente implicate nella diffusione delle malattie ospedaliere. Le sale operatorie nel 61% dei casi avevano valori di ATP che richiedevano una pulizia più accurata (Griffith *et al.*, 2000).

Nelle sale autoptiche, Maujean *et al.*, (2012) hanno monitorato i tavoli settori, i supporti per la testa, i vassoi portastrumenti, le bilance, i grembiuli, gli stivali e i guanti riutilizzabili. I microrganismi isolati sono risultati essere soprattutto saprofiti ambientali, incluso *S. aureus*, Stafilococchi coagulasi-negativi, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp. Soltanto alcune delle superfici campionate sono risultate pesantemente contaminate prima e dopo le pratiche di pulizia e disinfezione delle superfici delle sale autoptiche. Nelle *clean room* del settore farmaceutico (Ashour *et al.*, 2011) sono stati isolati soprattutto *Staphylococcus* e *Micrococcus* spp. in zone di classe C, D1, D2.

Gli aspetti di cui tener conto nella valutazione e gestione della contaminazione microbiologica degli ambienti sanitari sono diversi; tra questi, rivestono particolare importanza l'origine della contaminazione microbica e la sopravvivenza dei microrganismi nell'ambiente. Agenti patogeni in grado di persistere nell'ambiente nosocomiale e sulle attrezzature medicali possono causare focolai epidemici essendo possibile la loro trasmissione dall'ambiente, attraverso il personale sanitario, al paziente e da questo ad altre persone o direttamente dalle superfici o dalle attrezzature

medicali (più raramente, da acqua e aria) ai pazienti. I fattori che concorrono alla trasmissione di specifici patogeni da superfici contaminate all'uomo sono diversi (Tabella 2), tra cui la capacità di colonizzare le superfici e i pazienti, la bassa dose infettante (*Clostridium difficile*, norovirus), la sopravvivenza nell'ambiente del microorganismo per lunghi periodi di tempo, mantenendo la propria virulenza.

Tabella 2 - Caratteristiche microbiologiche che facilitano la trasmissione di patogeni presenti su superfici ambientali

- Sopravvivenza per lunghi periodi di tempo su superfici ambientali
- Capacità di mantenere la propria virulenza nell'ambiente
- Frequente contaminazione dell'ambiente ospedaliero
- Capacità di colonizzare pazienti (*Acinetobacter* spp., MRSA, VRE, *Clostridium difficile*)
- Capacità di colonizzare in via transitoria le mani degli operatori sanitari
- Trasmissione attraverso le mani contaminate degli operatori sanitari
- Bassa dose infettante (*Clostridium difficile*, norovirus)
- Resistenza ai disinfettanti usati sulle superfici ambientali (*Clostridium difficile*, norovirus)

Fonte: Weber *et al.*, 2010

Per valutare e controllare il rischio di infezione negli ambienti sanitari, normalmente vengono realizzati monitoraggi microbiologici di matrici (aria, acqua) e superfici ambientali di sale operatorie, reparti ospedalieri, unità di emodialisi, terapie intensive ecc. Le indagini ambientali relative alle superfici sono, tuttavia, generalmente limitate alla carica batterica totale e/o alla ricerca di specifiche specie batteriche comunemente responsabili di infezioni nosocomiali (Figura 1).

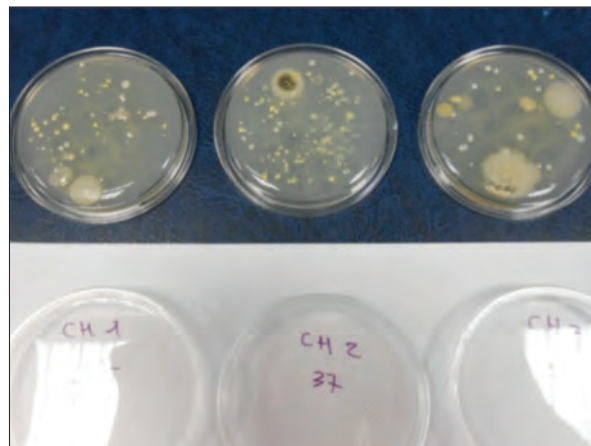


Figura 1 - Piastre Petri contaminate da microflora campionata da superfici

Ambienti “non sanitari”

Infezioni causate da ceppi di *Staphylococcus aureus* meticillina resistente (MRSA) sono state documentate non solo tra operatori sanitari, ma anche tra il personale che lavora a stretto contatto con gli animali, come allevatori, agricoltori e veterinari (Voss *et al.*, 2005; Garcia-Graells *et al.*, 2012 a). La trasmissione di questi ceppi batterici può avvenire a seguito del contatto diretto con gli animali, oppure con le superfici ambientali o mediante la manipolazione di carne contaminata (Petinaki e Spiliopoulou, 2012). Ceppi MRSA sono stati, inoltre, isolati da carni di suini, bovini, polli e pecore (Gharsa *et al.*, 2012; Quddoumi *et al.*, 2006). Infine, alcuni studi sulla colonizzazione o infezione degli animali domestici da parte di MRSA hanno dimostrato che tali ceppi sono trasmessi dall'animale all'uomo o viceversa e che le superfici ambientali delle cliniche veterinarie giocano un ruolo cruciale nella trasmissione (Faires *et al.*, 2010; Hanselman *et al.*, 2009). Alcuni studi hanno dimostrato una maggiore prevalenza di malattie croniche del tratto respiratorio, allergie, irritazione della mucosa degli occhi e delle alte vie respiratorie tra i lavoratori degli impianti di compostaggio rispetto a gruppi di controllo e ad altre categorie lavorative (Bünger *et al.*, 2007). Ad esempio, Gutarowska *et al.* (2015) hanno rilevato la presenza di alte concentrazioni di microrganismi mesofili (batteri e funghi) comprese tra $2,9 \times 10^2$ e $3,3 \times 10^3$ UFC/100 cm² su superfici di lavoro negli impianti di compostaggio. In questi ambienti i microrganismi, tra cui patogeni come *Aspergillus fumigatus* (Domingo e Nadal, 2009; Nadal *et al.*, 2009; Persoons *et al.*, 2010), loro frammenti, tossine e metaboliti (MVOCs: composti organici volatili microbici, endotossine e micotossine) vengono rilasciati nell'aria durante la produzione di compost con conseguente contaminazione delle superfici. I microrganismi predominanti nel bioaerosol e sulle superfici di questi ambienti lavorativi sono batteri mesofili e funghi (*Bacillus cereus*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. herbarum*, *Mucor hiemalis* e *Rhizopus oryzae*). Anche gli addetti agli impianti di trattamento delle acque reflue o allo smaltimento di rifiuti solidi possono entrare in contatto con diversi agenti patogeni, quali *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lep-tospira* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella typhi*, *Shigella* spp., enterovirus, rotavirus, virus epatitici, *Entamoeba histolitica*, *Giardia lamblia*, *Ascaris lumbricoides*, ecc.

Per quanto concerne invece gli ambienti *indoor*, Reynolds *et al.* (2005) hanno valutato la carica batterica totale in circa 200 campioni prelevati da superfici di negozi, asili nido, uffici, palestre, ristoranti e attrezzature da gioco per bambini, ecc. Il 93% dei campioni è risultato contaminato, in alcuni casi con concentrazioni batteriche molto alte (fino a 2×10^6 UFC/10 cm²); in 60 campioni prelevati da superfici ambientali sono stati isolati anche coliformi (7%) e batteri fecali (1,5%). In un altro studio, Elsergany *et al.* (2015) hanno trovato che, su un totale di 224 campioni prelevati da superfici di 4 diversi centri commerciali a Sharjah (Emirati Arabi Uniti), l'80% di essi mostrava cariche batteriche totali con valori medi da 500 a 1500 UFC/cm² (a seconda della tipologia di superficie esaminata), con presenza di *Staphylococcus aureus*. Infine, Shaughnessy *et al.* (2013) hanno raccolto 6480 campioni da superfici diverse (banchi, porte, tavoli

mensa e lavelli e dei bagni) di 27 scuole elementari nel sud-ovest degli Stati Uniti e misurato i livelli di ATP prima e dopo gli interventi di pulizia, proponendo un approccio standardizzato per la valutazione dell'efficacia degli interventi di pulizia e per individuare *range* di accettabilità dei livelli di ATP negli ambienti scolastici.

Nella rilevazione della contaminazione microbiologica delle superfici di libri, libri di antiquariato, manoscritti, documenti, dischi presenti in biblioteche e archivi è emersa la presenza di *Cladosporium herbarum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium corylophilum*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* spp., *Aspergillus sydowii*, *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus usus*, ecc. (Zielińska-Jankiewicz *et al.*, 2008). I risultati dello studio indicano condizioni igieniche insoddisfacenti negli ambienti di lavoro esaminati per la presenza di muffe potenzialmente patogene (effetti allergici o tossici) ed evidenziano la necessità di adottare misure adeguate per la riduzione del rischio.



Figura 2 - Monitoraggio di superfici in ambiente non sanitario

Campionamenti di batteri e funghi sono stati eseguiti anche in ambienti domestici. In particolare, condotti sulle superfici interne di abitazioni (travetti, pavimenti, bordi piani) la specie più comunemente ritrovata è rappresentata da *Penicillium chrysogenum*, ma sono stati rilevati anche *Penicillium glabrum*, *Penicillium corylophilum* (Bech-Andersen e Elborne, 2003).

Nel lavoro di Adams *et al.* (2013), sono stati campionati 4 edifici della zona universitaria che non presentavano evidenti problematiche di inquinamento fungino. Le superfici interne hanno dimostrato una contaminazione fungina simile a quella esterna agli edifici. I generi fungini *Cladosporium* e *Cryptococcus* erano abbondanti sulle soglie e non erano stati riscontrati all'esterno. Sulle tubature sono stati trovati generi termotolleranti come *Exophiala*, *Candida* e *Fusarium*.

In altri lavori sono state analizzate le cucine di abitazioni (Flores *et al.*, 2012) e ospedali

(Konecka-Matyjek *et al.*, 2012). Nelle cucine di 4 case sono stati rilevati batteri su 80 superfici diverse. Mediante il sequenziamento del gene 16S rRNA, sono stati identificati batteri appartenenti ai generi *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Proteobacteria*. Le comunità maggiori sono risultate associate a superfici non frequentemente pulite, come fornelli, porte dei frigoriferi o dei refrigeratori e pavimenti.

In uno studio (Cetin *et al.*, 2012), è stata valutata l'incidenza di alcune popolazioni microbiche sulle superfici di diversi impianti di lavorazione della carne rossa. La contaminazione da mesofili totali (TMC) rilevata su pavimento, parete e superfici di contatto con la carne oscilla rispettivamente da 2,71 a 3,15, da 0,69 a 1,56 e da 2,23 a 3,0 \log_{10} UFC/cm².

In definitiva dalla letteratura emerge chiaramente quanto il problema della contaminazione delle superfici in ambienti lavorativi e non, sia percepito e confermato dai risultati dei monitoraggi microbiologici effettuati e come le misure da attuare per la prevenzione e il controllo della contaminazione debbano necessariamente prevedere la programmazione di monitoraggi microbiologici ambientali, l'utilizzo di idonei disinfettanti e la valutazione dell'efficacia degli interventi di pulizia e disinfezione condotte sulle superfici.



3. Aspetti normativi

La normativa in materia di salute e sicurezza sul lavoro

La valutazione della contaminazione microbiologica ambientale non è esplicitamente menzionata tra le misure di tutela contemplate dalla normativa in materia di salute e sicurezza negli ambienti di lavoro. Tuttavia, la sua valenza ai fini della corretta gestione dei rischi per la salute dei lavoratori è implicitamente affermata laddove le prescrizioni contenute nel d.lgs. 81/2008 e s.m.i. obbligano il datore di lavoro a sottoporre a regolare *pulizia* luoghi di lavoro, impianti e dispositivi, *onde assicurare condizioni igieniche adeguate* (art. 64) e a disporre affinché le *superfici* dei pavimenti, delle pareti, dei soffitti siano tali da poter essere *pulite e deterse per ottenere condizioni adeguate di igiene* (Allegato IV, p.to 1.3).

In tutte le attività lavorative in cui la valutazione abbia evidenziato rischi biologici per la salute dei lavoratori (Titolo X, artt. 272 e 273), si impone altresì al datore di lavoro di:

- Adottare misure tecniche, organizzative e procedurali *finalizzate alla prevenzione e alla protezione dal rischio, ovvero misure igieniche per prevenire e ridurre al minimo la propagazione accidentale di un agente biologico fuori dal luogo di lavoro;*
- *Verificare la presenza di agenti biologici sul luogo di lavoro* al di fuori del contenimento fisico primario, se necessario e tecnicamente realizzabile.

La verifica dell'*adeguatezza* delle condizioni igieniche e della salubrità ambientale non può prescindere dalla conoscenza dei livelli di contaminazione microbiologica e della tipologia di contaminanti rinvenuti.

Normazione tecnica e linee di indirizzo

Non sono disponibili testi normativi specifici per il controllo microbiologico delle superfici. Alcune norme tecniche e documenti di Organismi scientifici, tuttavia, approcciano in qualche modo questo argomento e possono costituire una base di riferimento anche per gli ambienti di lavoro in generale. Gli ambiti in cui risulta muoversi la letteratura nazionale e internazionale in materia di analisi microbiologica delle superfici sono principalmente due: "Sanitario-Farmaceutico" e "Alimenti e mangimi per animali".

SETTORE SANITARIO-FARMACEUTICO

Nel settore sanitario-farmaceutico le norme tecniche che trattano il controllo della

biocontaminazione di “Camere bianche ed ambienti associati e controllati” sono le UNI EN ISO 14644-1 e 2:2015 e le UNI EN ISO 14698:2004. Esse appartengono “...a una serie di norme che prendono in considerazione i fattori importanti per la progettazione, le specifiche, il funzionamento e il controllo delle camere bianche e di altri ambienti controllati”.

UNI EN ISO 14644-1 e 2:2015 “Camere bianche ed ambienti associati controllati - Classificazione della pulizia dell’aria”

La UNI EN ISO 14644-1 definisce le classi di pulizia (ISO 1, ISO 2 ecc.) e i livelli di contenuto particellare massimo previsti per ogni ambiente controllato (Tabella 3).

Tabella 3 - Classi di contaminazione (tratto dalla ISO 14644-1:2015)

ISO 14644-1:2015(E)

Table 1 — ISO Classes of air cleanliness by particle concentration

ISO Class number (N)	Maximum allowable concentrations (particles/m ³) for particles equal to and greater than the considered sizes, shown below ^a					
	0,1 µm	0,2 µm	0,3 µm	0,5 µm	1 µm	5 µm
1	10 ^b	d	d	d	d	e
2	100	24 ^b	10 ^b	d	d	e
3	1 000	237	102	35 ^b	d	e
4	10 000	2 370	1 020	352	83 ^b	e
5	100 000	23 700	10 200	3 520	832	d, e, f
6	1 000 000	237 000	102 000	35 200	8 320	293
7	c	c	c	352 000	83 200	2 930
8	c	c	c	3 520 000	832 000	29 300
9g	c	c	c	35 200 000	8 320 000	293 000

^a All concentrations in the table are cumulative, e.g. for ISO Class 5, the 10 200 particles shown at 0,3 µm include all particles equal to and greater than this size.

^b These concentrations will lead to large air sample volumes for classification. Sequential sampling procedure may be applied: see Annex D.

^c Concentration limits are not applicable in this region of the table due to very high particle concentration.

^d Sampling and statistical limitations for particles in low concentrations make classification inappropriate.

^e Sample collection limitations for both particles in low concentrations and sizes greater than 1 µm make classification at this particle size inappropriate, due to potential particle losses in the sampling system.

^f In order to specify this particle size in association with ISO Class 5, the macroparticle descriptor M may be adapted and used in conjunction with at least one other particle size. (See 5.2.1)

^g This class is only applicable for the in-operation state.

La parte 9 della norma UNI EN ISO 14644:2015 stabilisce i livelli di pulizia delle superfici delle camere bianche e ambienti associati, individuando criteri di classificazione basati sulla concentrazione delle particelle, limitatamente a quelle comprese tra 0,05 e 500 µm. Essa fornisce anche indicazioni circa la presenza di diversi metodi e procedure per determinare la concentrazione delle particelle su superfici.

UNI EN ISO 14698:2004 "Camere bianche e ambienti associati controllati - Controllo della biocontaminazione"

La Parte 1 della norma descrive, in particolare, i principi generali e i metodi "...destinati a promuovere pratiche di igiene appropriate ...". Il controllo della biocontaminazione nella "*clean room*" è finalizzato alla *sicurezza* e alla *stabilità* del prodotto e dei processi *sensibili all'igiene* e non specificamente alla tutela della salute dell'operatore che svolge la sua attività in tali particolari contesti di lavoro.

Questa norma fornisce indicazioni tecniche utili ai fini della predisposizione e realizzazione di piani di monitoraggio ambientale (aria e superfici), alcune delle quali di seguito elencate.

- Il campionamento deve essere effettuato quando l'area è in condizioni operative e di massima sollecitazione (ad esempio, prima della fine del turno di lavoro o durante il periodo più intenso dell'attività). Tuttavia, anche il campionamento nelle condizioni di riposo può fornire informazioni utili in merito alla progettazione e alle prestazioni del sistema in esame.
- Il piano di campionamento deve tener conto del livello di pulizia della zona di rischio e del grado di controllo della biocontaminazione richiesto per l'attività condotta.
- Ai fini del campionamento devono essere individuati "punti di controllo" (cioè punti in cui è possibile prevenire, eliminare o ridurre un pericolo a livelli accettabili) e "zone di rischio" (cioè spazi definiti e delimitati in cui sussiste vulnerabilità alla contaminazione). Queste ultime possono essere classificate secondo il livello di biocontaminazione aerea e superficiale (per esempio a basso, medio o alto rischio). Il monitoraggio delle zone di rischio deve essere eseguito a installazione/costruzione ultimata, a riposo e, sistematicamente, anche durante l'attività.
- È opportuno definire preliminarmente un "livello di azione" - cioè un livello di biocontaminazione che se superato richiede l'intervento immediato, insieme alla ricerca della causa e all'azione correttiva - ed un "livello di allerta" - cioè un livello che fornisce un tempestivo avviso di deviazione delle normali condizioni e che, se superato, dovrebbe far aumentare l'attenzione nei confronti del processo - nel contesto ambientale in esame, per rilevare con tempismo eventuali condizioni sfavorevoli.
- Il monitoraggio può essere eseguito attraverso la misura di indicatori indiretti, per esempio l'ATP. Tuttavia, potendovi non essere una relazione diretta tra la presenza di tali indicatori e la biocontaminazione, è essenziale che si proceda anche a una stima diretta della biocontaminazione.
- I risultati del monitoraggio devono essere riesaminati periodicamente al fine di confermare che il sistema funzioni in conformità alle procedure stabilite.

L'Appendice C della norma è dedicata specificamente alla determinazione della biocontaminazione delle superfici. Al riguardo:

- È auspicabile/necessario che il controllo della biocontaminazione avvenga nelle zone di rischio, raccogliendo campioni rappresentativi per la rilevazione della microflora vitale che può essere presente o che sia necessario controllare.

- La conta dei microrganismi su una superficie può avvenire tramite un dispositivo di contatto (ad es. slide, piastra a contatto) o un tampone. Le colonie risultanti forniscono una 'mappa' dell'immagine speculare delle unità vitali (UFC) originali. La conta della velocità di caduta dei microrganismi sulla superficie è ottenuta mediante l'esposizione, per un periodo noto, di una superficie nutritiva di area nota, che è quindi incubata; le colonie risultanti forniscono il tasso di deposizione per area per periodo.
- L'utilizzo di tamponi sterili inumiditi, spugne o simili è particolarmente utile per il campionamento di grandi superfici non assorbenti, irregolari o nascoste, non accessibili ai dispositivi di contatto.
- Le piastre a sedimentazione sono idonee per la valutazione qualitativa e quantitativa.
- Il numero delle particelle vitali presenti su piastre a contatto deve essere espresso in UFC/100 cm², mentre nel caso delle piastre a sedimentazione, UFC/100 cm² sedimentate in un'ora.

L'Appendice D è dedicata alla determinazione della biocontaminazione dei materiali tessili. Al riguardo:

- Per la determinazione delle particelle vitali (UFC) possono essere utilizzati dispositivi per contatto. Se possibile, il tessuto dovrebbe essere appoggiato a una superficie dura, piatta e liscia prima che la piastra a contatto venga applicata. Il numero delle particelle vitali dovrebbe essere espresso in unità vitali (UFC) per 1 dm² (100 cm²).
- La presentazione grafica dei risultati raccolti su un determinato periodo di tempo può essere utile al fine di verificare un'eventuale variazione significativa anche quando i risultati rientrano nei limiti specificati. Per fornire un mezzo obiettivo e statisticamente valido si possono applicare metodi con carte di controllo, al fine di valutare la qualità delle zone di rischio. È essenziale che le registrazioni descrivano per ogni misurazione l'approccio intrapreso.

EU GMP Guide 2008 - ANNEX I "Buone prassi di fabbricazione di medicinali per uso umano e veterinario"

Nell'Annex I sono indicati i requisiti che devono avere gli ambienti adibiti alla fabbricazione di prodotti sterili, sulla base di specifiche caratteristiche ambientali. Ogni operazione durante la produzione di medicinali necessita di un adeguato livello di pulizia dell'ambiente, allo scopo di minimizzare il rischio di contaminazione del prodotto. Sono definite 4 classi di ambienti sulla base della concentrazione delle particelle aerodisperse (Tabella 4). Operazioni ad alto rischio di contaminazione (per esempio le fasi di riempimento e sigillatura di ampolle e fiale, ecc.) durante la fabbricazione di prodotti sterili sono condotte negli ambienti di classe A, mentre procedure meno critiche sono svolte negli ambienti di classe B, C e D. In Tabella 4 sono mostrate le concentrazioni massime prescritte in funzione della classificazione delle zone.

Tabella 4 - Classificazione degli ambienti utilizzati per la fabbricazione di medicinali per uso umano e veterinario

Classe	In condizioni non operative		In condizioni operative	
	Quantità massima ammissibile di particelle (0,5-5 µm) per m ³			
	0,5 µm	5 µm	0,5 µm	5 µm
A	3 520	20	3 520	20
B	3 520	29	352 000	2 900
C	352 000	2 900	3 520 000	29 000
D	3 520 000	29 000	Non definita	Non definita

Fonte: EU (2008) EudraLex "The Rules Governing Medicinal Products in the European Union", Volume 4, Annex 1

Come è possibile notare, si rilevano alcune equivalenze tra le classi di contaminazione e la tipologia di particelle da campionare (diametro compreso tra 0,5 e 5 µm) dell'Annex 1 e quelle delle UNI EN ISO 14644-1 e 2: ad es. la classe B è equivalente all'ISO 5 in condizioni di "non operatività" ed all'ISO 7 in condizioni di "operatività", mentre la classe D è equivalente all'ISO 8 in condizioni "non operative" e non definita in condizioni "operative".

Nell'Annex I sono indicati anche i valori limite di contaminazione microbiologica negli ambienti controllati in condizioni "operative" (Tabella 5).

Tabella 5 - Valori limite di contaminazione microbiologica

Classe	Valori limite di contaminazione microbiologica			
	Campione d'aria UFC/m ³	Piastre di sedimentazione (diametro 90 mm), UFC/4 ore	Piastre a contatto (diametro 55 mm), UFC/piastra	Impronta del guanto a 5 dita UFC/guanto
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Fonte: EU (2008) EudraLex "The Rules Governing Medicinal Products in the European Union", Volume 4, Annex 1

Negli ambienti di classe A, la concentrazione dei microrganismi nell'aria o sulle superfici è sempre inferiore a 1 Unità Formante Colonia (UFC) per unità di volume d'aria o di superficie considerata.

Linee guida ISPESL "Linee guida sugli standard di sicurezza e di igiene del lavoro nel reparto operatorio" 2009

Il documento Ispesl al par. 3.2 fornisce indicazioni specifiche (criteri operativi, meto-

dologie di indagine, frequenza dei prelievi) e criteri interpretativi per valutare i livelli di contaminazione presenti nei reparti ospedalieri, al fine di poter intervenire tempestivamente sottoponendo, se necessario, a revisione l'intero protocollo di pulizia adottato. Secondo tali indicazioni, i prelievi devono essere condotti in corrispondenza di punti critici, ritenuti più a rischio (Tabella 6 e Tabella 7). L'interpretazione dei risultati ottenuti dal monitoraggio microbiologico delle superfici tiene conto delle indicazioni riportate nella UNI EN ISO 14698:2004 e di quelle presenti nella Guida francese alle buone pratiche *Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé - CCLIN Sud-Ouest* (1999).

Si tratta, comunque, di indicazioni finalizzate alla prevenzione del rischio infettivo per i pazienti e indirettamente alla protezione del personale sanitario che opera nei reparti operatori.

Tabella 6 - Valori soglia dei prelievi sulle superfici. Criteri di decisione

Locali	Obiettivi	Tecniche	Risultati attesi (UCF/piastra)	Provvedimenti se risultati non conformi
Sale operatorie	Conformità della disinfezione e del trattamento dell'aria	Contatto	≤5 UFC/piastra	Se $5 < X \leq 15$: accettabile . Se > 15 in 1 solo punto: segnalazione . Se > 15 in 2-4 punti: rivedere il protocollo di pulizia e la sua attuazione . Se > 15 in 5 o più punti: inaccettabile ; ripetere il controllo.
Altri ambienti "critici" (sale per esami invasivi in cavità sterili ecc.)				Se presenti <i>S. aureus</i> , enterobatteri, <i>Aspergillus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.: rivedere interamente il protocollo di pulizia e programmare nuovi controlli
Degenza pre/post intervento, Rianimazione, Neonatologia	Controllo del protocollo di disinfezione e conformità della pulizia	Contatto	≤50 UFC /piastra Senza agenti patogeni: <i>S. aureus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.	Se > 50: rivedere il protocollo .

Fonte: Ispesi, 2009

Tabella 7 - Locali e punti di prelievo delle superfici

Locali	Esempi di punti di prelievo
Sala operatoria	Letto operatorio, scialitica, tavolo servitore, pavimento, carrelli, attrezzature, maniglia delle porte, interfonni, superfici verticali, bocchette di immissione ed estrazione dell'aria
Altri ambienti "critici" (sale per esami invasivi in cavità sterili ecc.)	
Sub-sterilizzazione	Rif. Linee Guida Ispesl "Sterilizzazione"
Isola neonatale	Rif. Linee Guida Ispesl "Blocco Parto"

Fonte: Ispesl, 2009

Il documento del CCLIN è stato aggiornato nel 2016; i criteri presentati nella versione del 1999 sono stati sostanzialmente confermati e sono stati ampliati quelli di classificazione delle zone con relativi valori di riferimento (Tabella 8).

Tabella 8 - Valori soglia dei prelievi di superficie in funzione degli ambienti. Criteri di decisione (tratto da CCLIN, 2016)

Classe de risque ou classe de propreté particulière	Risque 4 ou ISO 5	Risque 3 ou ISO 7	Risque 2 ou ISO 8	Risque 1
Valeurs cibles hors présence humaine/25 cm²				
FAR	≤ 1	≤ 5	≤ 25	*
<i>Aspergillus</i> sp.	< 1	< 1	< 1	
Micro-organismes indicateurs	< 1	< 1	< 1	

* à déterminer par ES en fonction de l'objectif.

Classe de risque des Bonnes Pratiques	Classe A	Classe B	Classe C	Classe D
Valeurs cibles en activité/25 cm²				
FAR	≤ 1	≤ 5	≤ 25	≤ 50
« moisissures »	< 1	< 1	< 1	< 1
Micro-organismes indicateurs	< 1	< 1	< 1	< 1

Zone	Lavage		Conditionnement et sortie stérile	
	Hors présence humaine	Hors présence humaine	En présence humaine	
Satisfaisant	< 5	< 5	< 15	
Acceptable	5 < X < 15	5 < X < 15	15 < X < 30	
Si X ≥ acceptable	X > 15	X > 15	X > 30	
1 point NA	Signaler	Signaler	Alerte : revoir les comportements ou le nombre d'agents présents...	
2 à 4 points NA	Revoir nettoyage	Revoir nettoyage		
≥ 5 points NA	Inacceptable	Inacceptable		
Si présence de <i>Staphylococcus</i> , Entérobactéries, <i>Pseudomonas</i> , <i>Aspergillus</i> : revoir procédure de nettoyage - contrôle				

NA = non acceptable

Fonte: Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé. Guide de bonnes pratiques. CCLIN 2016

In particolare, nell'aggiornamento 2016 si consiglia di non effettuare campionamenti sistematici sulle superfici delle aree di lavoro, a meno che queste non richiedano elevati standard di qualità ambientale (come, ad esempio, nel caso di superfici di blocchi operatori o, in campo alimentare, di superfici critiche ai fini dell'HACCP) o non si sia verificato un evento infettivo con sospetta origine da inquinamento ambientale. I prelievi debbono svolgersi in assenza del personale e dopo adeguato lasso di tempo dalle operazioni di pulizia. Inoltre, il monitoraggio su pavimenti e pareti viene consigliato nell'eventualità in cui si sospetti un inquinamento fungino.

CDC LINEE GUIDA PER IL CONTROLLO AMBIENTALE DELLE INFEZIONI NELLE STRUTTURE SANITARIE

A livello internazionale, altre indicazioni tecniche utili ai fini della predisposizione di piani di monitoraggio ambientale sono presenti nelle Linee guida del *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2003) per il controllo delle infezioni in ambienti sanitari. Di seguito si riportano, in particolare, così come descritte nel documento, alcune indicazioni di carattere generale per la progettazione di un corretto piano di campionamento su superfici ambientali.

- Preliminarmente al campionamento, è necessario: acquisire informazioni di *background* in materia, consultando la letteratura scientifica e, in particolare, i risultati di eventuali studi epidemiologici condotti nel campo; localizzare opportunamente nell'ambiente la superficie da sottoporre a monitoraggio; selezionare le tecniche più appropriate di campionamento (qualitativo e/o quantitativo) e analisi dei campioni (da cui dipende la significatività dei risultati), il numero dei campioni da raccogliere, la necessità di repliche e di eventuali "campioni di controllo" o di comparazione adeguatamente prelevati (per poter escludere la presenza di contaminanti estranei) e i parametri microbiologici da analizzare; disporre in anticipo di una stima del numero massimo o del tipo di microrganismo accettabili e di un piano di azioni correttive.
- Il campionamento di superfici può essere condotto a scopo di ricerca o come parte di una indagine epidemiologica (per verificare se la superficie rappresenta un potenziale serbatoio di patogeni o una fonte di contaminazione o per analizzare la sopravvivenza dei microrganismi sulla superficie stessa) oppure come controllo specifico per l'assicurazione di qualità. Se il campionamento è condotto come parte di uno studio epidemiologico, in caso di epidemie, è preferibile l'isolamento microbico a livello di specie e la caratterizzazione oltre il livello di specie.
- L'efficacia del campionamento richiede la presenza di umidità, ottenuta, se non presente sulla superficie, tramite umidificazione del dispositivo di prelievo - e l'utilizzo di neutralizzanti nel diluente o nel mezzo di coltura - se si sospetta la presenza di residui di disinfettanti.
- Una superficie che non ha prodotto crescite microbiche non rappresenta una superficie sterile: bisogna, infatti, considerare il livello di sensibilità del metodo adottato.

- Nel valutare i risultati è importante considerare il grado atteso di contaminazione associato alla 'categoria' di superficie in esame, identificata sulla base della classificazione di Spaulding (cfr. Capitolo 7) che correla i requisiti di pulizia o sterilità dei dispositivi medici e degli strumenti al loro specifico impiego e, di conseguenza, all'entità del rischio di infezione.

SETTORE ALIMENTI E MANGIMI PER ANIMALI

Nell'industria alimentare, materie prime di origine animale e vegetale sono trasformate in prodotti alimentari nel rispetto di precise norme igieniche. Un alimento manipolato in modo non appropriato o esposto ad inquinanti di varia natura può causare danni alla salute del consumatore e del lavoratore. Durante la produzione, la lavorazione, la conservazione e il trasporto, qualsiasi alimento può essere contaminato da sostanze tossiche o microrganismi patogeni (quali ad esempio *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* e *C. perfringens*, *E.coli* ecc.), virus (epatite A, enterovirus, rotavirus, Norwalk, ecc.), protozoi (*Giardia*, ecc.), elminti (*Echinococcus granulosus*), funghi (*Aspergillus fumigatus*).

Nel settore della microbiologia dei prodotti destinati all'alimentazione umana ed animale, diverse sono le norme tecniche emanate sul prelievo e l'analisi dei campioni. I campionamenti sono condotti ai fini dell'*Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCP), cioè della prevenzione dei pericoli di contaminazione degli alimenti, sottoponendo a monitoraggio l'intera filiera del processo di produzione e distribuzione per individuare le fasi che possono rappresentare un punto critico per la qualità dell'alimento stesso.

La prima normativa europea che tratta l'igiene dei prodotti alimentari è la direttiva 43/93/CEE, recepita in Italia con il d.lgs. 155 del 1997. Questa normativa è stata poi sostituita dai regolamenti europei 852, 853, 854 e 882 del 2004. Conseguentemente in Italia il d.lgs. 155/97 è stato abrogato e il recepimento dei sopra citati regolamenti europei del 2004 è avvenuto con d.lgs. 193/07, che riprende le procedure di autocontrollo basate sui principi del sistema HACCP.

NORMA ISO 18593:2004 - Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs

La norma è applicabile nell'ambito della lavorazione di prodotti destinati all'alimentazione. Tale norma fornisce indicazioni relative al campionamento e all'analisi che possono essere utili anche per il campionamento delle superfici presenti in altri ambienti lavorativi. Al riguardo:

- Il campione da raccogliere deve essere rappresentativo e non aver subito alterazioni da residui di disinfettanti. Nel caso in cui la superficie da monitorare sia stata sottoposta a disinfezione, la scelta del neutralizzante da impiegare deve tener conto del tipo di disinfettante usato (sale di ammonio quaternario, anfoteri, pro-

dotti alogenati, disinfettanti a base di perossido), non essendo disponibile un neutralizzante ad azione universale;

- Il ricorso ai metodi di campionamento che utilizzano piastre a contatto, tamponi, spugnette è utile per *"trend analysis"*, non fornendo essi risultati riproducibili dal punto di vista dell'analisi quantitativa;
- Per il rilevamento di microrganismi patogeni specifici, all'utilizzo di piastre a contatto deve preferirsi quello di tamponi, esaminando una superficie pari ad *almeno* 100 cm²;
- La durata del trasporto dei campioni prelevati con tamponi sterili non dovrebbe superare le 4h a temperatura compresa tra 1 e 4°C.

Dal momento che le piastre a contatto e i tamponi non forniscono il medesimo risultato analitico, è necessario dichiarare nel certificato analitico quale metodo è stato impiegato.

NORMA ISO 4833:2013 - Microbiologia della catena alimentare - Metodo orizzontale per la conta dei microrganismi - Parte 2: Conta delle colonie a 30 °C con la tecnica dell'inseminazione in superficie

Anche questa norma è applicabile alla lavorazione dei prodotti destinati all'alimentazione, lo stesso vale per la norma ISO 4833-2:2013, che oltretutto introduce limitazioni di applicabilità negli stessi prodotti destinati al consumo umano o animale. La norma descrive un metodo per la stima su terreno solido *Plate Count Agar* (PCA) di microrganismi aerobi presenti in prodotti destinati al consumo umano o animale. Il metodo è applicabile anche ai fini della valutazione della presenza degli stessi microrganismi nell'area di produzione degli alimenti e mangimi, ma la modalità di campionamento sulle superfici interessate non è descritta nella norma.

Norma UNI 11527:2014 - Beni culturali - Rilevamento della carica microbica dell'aria in ambienti interni - Metodo di campionamento passivo mediante piastre di sedimentazione

La norma riguarda la metodologia per il rilevamento quali-quantitativo della microflora vitale coltivabile diffusa nell'aria di ambienti interni mediante campionamento passivo. Il metodo consiste nell'esposizione all'aria di capsule di Petri contenenti terreno culturale solido; ciò permette di determinare i microrganismi vitali aerodiffusi che possono depositarsi su di una superficie per gravità o movimenti aerodinamici. Il metodo risulta più adatto al rilevamento di batteri eterotrofi coltivabili e micro funghi. Per l'elaborazione del resoconto di prova, la norma include un modello di scheda per il rilevamento dei dati dell'ambiente esaminato e una scheda per l'espressione dei risultati del monitoraggio.

In conclusione, nonostante il campo d'applicazione e le finalità diversi da quelli di interesse, le norme tecniche destinate al settore Sanità e Alimenti/mangimi possono essere, comunque, fonte di indicazioni utili sia sotto il profilo tecnico che operativo, ai fini della pianificazione e realizzazione di monitoraggi microbiologici delle superfici in campo occupazionale.

4. Panoramica sulle principali tecniche di campionamento e analisi

I risultati ottenuti nel monitoraggio microbiologico delle superfici dipendono dalla selezione di una o più tecniche appropriate in funzione delle caratteristiche dell'ambiente, delle superfici da esaminare, degli obiettivi del monitoraggio. Ad oggi non è stato individuato un metodo ottimale, ufficialmente riconosciuto per monitorare i livelli di igiene delle superfici o rilevare la presenza di uno specifico microrganismo patogeno in campo occupazionale.

Di seguito, si esaminano le principali tecniche utilizzabili.

Piastre sterili a contatto

Le piastre sterili a contatto (RODAC - *Replicate Organism Direct Agar Contact*) sono piastre sulle quali si trova solidificato il terreno nutritivo agarizzato, che forma un menisco convesso sporgente rispetto al bordo della piastra. Le piastre vengono poste a contatto con le superfici piane da esaminare, esercitando per alcuni secondi una leggera pressione o utilizzando appositi applicatori per standardizzare sia la pressione che il tempo d'applicazione della piastra sulla superficie (Figura 3). Possono essere utilizzati diversi terreni, in funzione dei microrganismi che si vogliono ricercare. Dopo incubazione, effettuata alla temperatura e nei tempi previsti per i diversi microrganismi, si procede alla lettura dei risultati che vengono espressi in UFC/unità di superficie. Se, sulle superfici da esaminare, si suppone la presenza di residui di disinfettanti, si possono utilizzare specifici neutralizzatori chimici da aggiungere al terreno di coltura.

L'utilizzo delle piastre RODAC è molto diffuso, sia come tecnica a se stante che in associazione ad altre, anche per la facilità di utilizzo. Una limitazione di questo metodo è data dall'impossibilità di raggiungere alcuni punti critici quali angoli e curvature, per cui tale metodo può essere utilizzato solo su superfici lisce. Altro limite è riscontrabile in caso di carica batterica molto elevata, in quanto vi è il rischio di sottostimare la conta batterica a causa dell'aggregazione delle colonie batteriche sulla superficie e della loro confluenza.

La contaminazione microbiologica delle superfici negli ambienti lavorativi

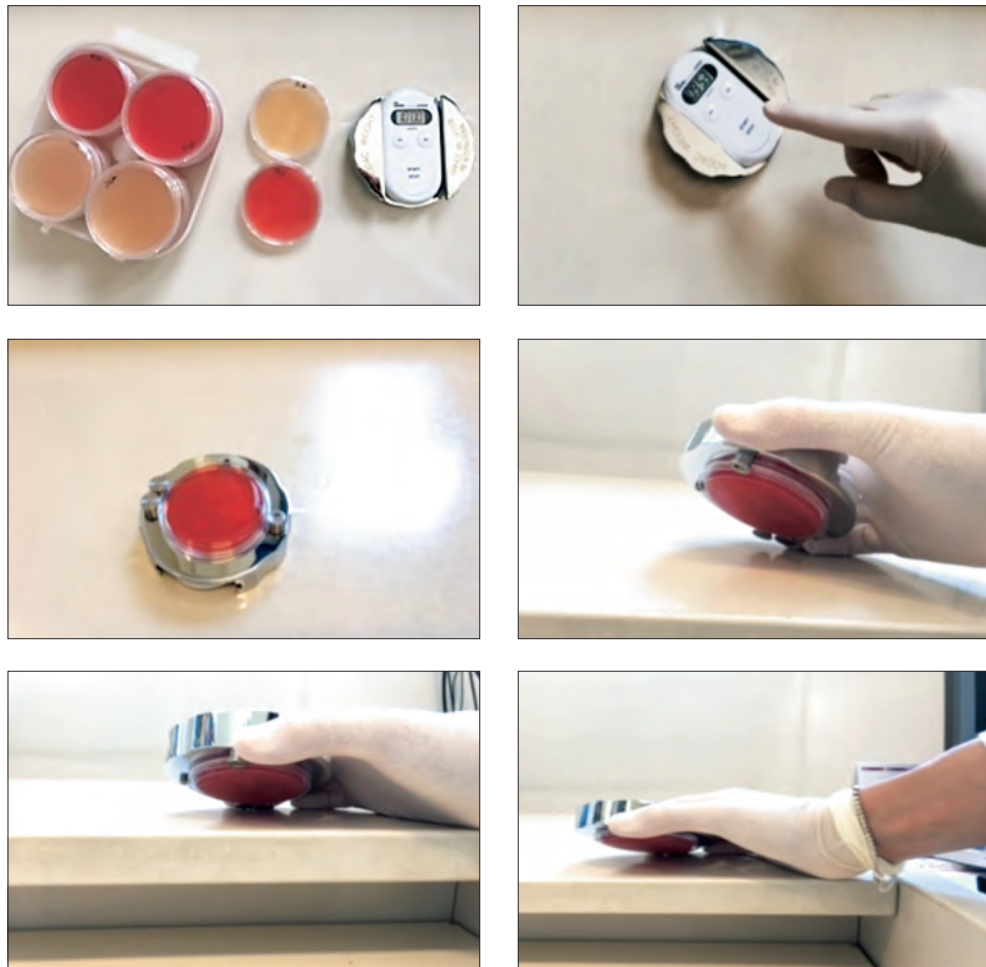


Figura 3 - Procedura per il campionamento di superfici mediante applicatore

Le Linee Guida sugli Standard di Sicurezza e di Igiene del Lavoro nel Reparto Operatorio (Ispesl, 2009) propongono l'utilizzo, su superfici piane non assorbenti, di piastre RODAC da 24 cm² o comunque con superficie di contatto superiore a 20 cm², contenenti terreni di coltura idonei per i microrganismi ricercati. Il tempo di contatto tra piastra e superficie deve essere non inferiore a 10 secondi, applicando una pressione uniforme e costante sull'intera area (viene consigliato l'uso di specifici applicatori per consentire una migliore standardizzazione del metodo). L'incubazione delle piastre deve essere effettuata nel più breve tempo possibile e, comunque, entro 12 ore dal campionamento.

La tecnica delle piastre a contatto è stata utilizzata per il monitoraggio delle superfici

presenti in diverse zone di *clean room* del settore farmaceutico (Ashour *et al.*, 2011). Questa tecnica, insieme a quella dei tamponi sterili con utilizzo di *Trypticase Soy Agar* (TSA) e *Tryptose Sulfite Cycloserine* (TSC) per l'identificazione dei microrganismi, è stata utilizzata per il campionamento in triplicato delle superfici presenti in sale autoptiche (tavoli settori da necropsia, supporti per la testa, tavole drenanti, vassoi portastrumenti, bilance, e grembiuli riutilizzabili - Maujean *et al.*, 2012). In questi ambienti il campionamento microbiologico può essere considerato un buon metodo per il monitoraggio delle pratiche di pulizia nelle sale dove vari agenti infettanti possono contaminare l'ambiente e aumentare il rischio di esposizione professionale. In uno studio effettuato su ambienti domestici (Bech-Andersen e Elborne, 2003) le superfici interne di una abitazione (travetti, pavimenti, bordi piani) sono state campionate con piastre a contatto da 25 cm².

La tecnica delle piastre a contatto RODAC è stata utilizzata anche per la rilevazione della contaminazione microbiologica delle superfici di libri, libri di antiquariato, manoscritti, documenti, registrazioni, presenti in biblioteche e archivi. I risultati sono stati espressi come UFC/100 cm² (Zielińska-Jankiewicz *et al.*, 2008).

La metodica delle piastre a contatto è stata utilizzata anche per confrontare la contaminazione microbica di indumenti da lavoro convenzionali (Figura 4) rispetto a quelli nel cui tessuto è presente fibra di argento, indossati da personale sanitario durante il servizio di emergenza medica in ambulanza (Groß *et al.*, 2010).

Anche nella valutazione della sterilità dei sistemi di protezione personale (Kearns *et al.*, 2011), sono state utilizzate piastre a contatto RODAC con terreno TSA più lecitina e polisorbato 80, incubate a 36 °C per 24 - 48 ore a 5% CO₂.



Figura 4 - Campionamento di tessuto tramite piastre a contatto con applicatore

In un reparto di terapia intensiva è stata anche indagata la contaminazione batterica dei guanti monouso di lattice non sterili in una situazione di utilizzo reale e di con-

trollo, considerando il tempo di esposizione ambientale (Menis Ferreira *et al.*, 2011). La punta delle dita di ciascun guanto indossato dagli operatori (mano dx e sx) è stata pressata su piastre Petri di 150 mm di diametro, contenenti agar Mueller Hinton. Le piastre a contatto sono state utilizzate anche per testare, rispetto a superfici di controllo lisce, la capacità di un modello tecnologico di superficie di ridurre la colonizzazione da parte di *Staphylococcus aureus* meticillina-sensibile (MSSA) e *S. aureus* meticillina-resistente (MRSA)¹.

Tamponi sterili

I tamponi permettono di effettuare il campionamento microbiologico anche su superfici difficili da raggiungere: ad esempio, dietro i rubinetti (Kac *et al.*, 2004) e le tubature (Martirosian, 2006) o lungo le testiere del letto (Eckstein *et al.*, 2007). Questa metodologia viene preferita per campionare su superfici lisce non porose di ambienti sia *indoor* che *outdoor* (ad esempio, superfici in acciaio, pareti, piastrelle, laminati di legno, ecc. - Figura 5).

L'uso di tamponi permette di ottenere informazioni sia di tipo qualitativo che quantitativo. Nelle analisi di tipo quantitativo occorre delimitare un'area nota attraverso l'utilizzo di una mascherina di dimensioni di cm 10x10 (Figura 5), all'interno della quale strofinare il tampone, seguendo traiettorie che coprano tutta la superficie da analizzare in senso orizzontale, verticale e in diagonale (CDC, 2012). Il tampone deve essere quindi immerso in una provetta da centrifuga munita di tappo.

In altri studi per il monitoraggio di virus e batteri il campionamento è stato effettuato delimitando due aree adiacenti di 36 cm² (Carducci *et al.*, 2011).

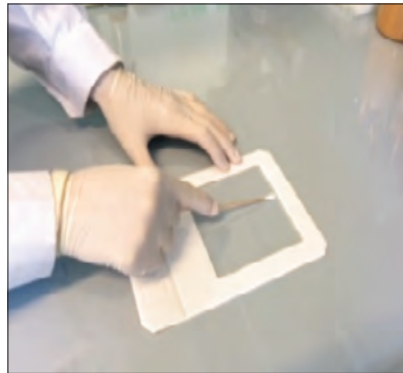


Figura 5 - Campionamento con metodica del tampone

¹ Recentemente, ispirandosi alla conformazione della superficie cutanea dello squalo, capace di inibire la crescita di microrganismi acquatici, è stato messo a punto un modello tecnologico di superficie in cui vengono riprodotti i dentelli dermici con motivo a rombi, rispettando i rapporti altezza/ampiezza presenti in natura nella pelle dello squalo (Magin *et al.*, 2015). Questa "rugosità" impercettibile (il *micropattern* non si può vedere a occhio nudo, né si può avvertire con le dita), di circa 3 m di altezza e 2 m di larghezza, sarebbe capace di inibire l'adesione e la crescita batterica. Con questo tipo di *micropattern* sono già disponibili sul mercato diversi dispositivi medici. Le piastre a contatto RODAC, di 60 mm di diametro, sono state pressate per 5 secondi sulle superfici da campionare, poi incubate a 37°C per 18-24h. Le colonie cresciute sono state registrate come UFC/RODAC. I risultati hanno dimostrato che queste superfici innovative, se usate in campo ospedaliero, potrebbero limitare la contaminazione da parte dei microrganismi patogeni.

La modalità con cui si effettua il campionamento rappresenta un fattore critico, perché influisce sul recupero dei microorganismi. È necessario pertanto adottare metodologie standardizzate che consentono di ottenere risultati ripetibili. Il campionamento deve essere svolto indossando guanti sterili; la punta del tampone sterile deve essere inumidita in una soluzione tampone neutralizzante prima di essere strofinata sulla superficie da testare. La soluzione neutralizzante previene, infatti, l'effetto inibitore dei residui di disinfettanti sulla crescita batterica (Dey e Engley, 1983 e 1995). La soluzione di neutralizzazione può essere efficace contro vari disinfettanti quali composti di ammonio quaternario, fenoli, iodio, prodotti chimici a base di cloro, mercuriali, glutaraldeide ed altri (Dey e Engley, 1983).

I tamponi sono disponibili in vari materiali: cotone, rayon (Carling *et al.*, 2006) o nylon (Hedin *et al.*, 2010). Il nylon consente un migliore recupero delle cellule microbiche, in quanto i microorganismi non penetrano all'interno del tampone, ma rimangono sulla sua superficie esterna. Ciò limita la perdita di cellule batteriche nella matrice del tampone e può incrementare fino al 60% la raccolta dei batteri dalla superficie (Dalmaso *et al.*, 2008). I tamponi di nylon, inoltre, comparati con quelli di rayon, presentano una maggiore sensibilità e una maggiore capacità di recupero di cellule di *S. aureus* dalla cute di pazienti clinici (Landers *et al.*, 2010; Verhoeven *et al.*, 2010; Saegeman, 2011) e una maggiore sensibilità anche quando vengono usati in campionamenti ambientali (Dolan *et al.*, 2011).

Ulteriori progressi hanno portato allo sviluppo di tamponi in schiuma poliuretana (Rose *et al.*, 2004; Hodges *et al.*, 2006; Lewandowski *et al.*, 2010) che consentono un aumento del 30% nel recupero di spore su superfici in acciaio.

Il campionamento con tamponi sterili è stato utilizzato in vari ambienti lavorativi (Lejeune, 2004). In ambiente ospedaliero, sono stati eseguiti prelievi su armadi, letti, lavandini, tavoli medici e sulle mani del personale per la ricerca di funghi e batteri Gram-negativi (Garcia-Cruz *et al.*, 2012 b).

In altri lavori sono state analizzate le cucine delle abitazioni civili (Flores *et al.*, 2012) e degli ospedali (Konecka-Matyjek *et al.*, 2012). L'uso dei tamponi nelle cucine degli ospedali ha consentito di dimostrare la necessità di aumentare gli standard di igiene nel corso delle operazioni di manipolazione degli alimenti (Konecka-Matyjek *et al.*, 2012). L'uso di tamponi è largamente diffuso nel settore alimentare. I test microbiologici per gli impianti di lavorazione delle carni rosse rappresentano uno dei migliori sistemi per identificare e monitorare i rischi potenziali nei programmi GMP e HACCP.

Comparazione tra tamponi e piastre a contatto

È stata trovata, in generale, una buona correlazione tra le due metodiche.

Silverman *et al.* (1981) hanno comparato tra loro il metodo delle piastre a contatto con quello che utilizza i tamponi nel corso di monitoraggi post-sanificazione effettuati su 27 superfici in acciaio inox, utilizzate in una installazione militare per la preparazione di alimenti. I tamponi (in cotone) hanno dimostrato una minore percentuale di recupero microbico rispetto al metodo delle piastre a contatto - probabilmente do-

vuta al fatto che il cotone, in fase analitica, non è in grado di rilasciare tutti i microrganismi catturati - e una minore riproducibilità, benché per entrambe le metodiche il *range* delle UFC conteggiate sia risultato piuttosto ampio. In entrambi i casi, il recupero microbico si è assestato sul 60%. In caso di valori di UFC superiori a 200, le piastre RODAC sono risultate tutte non numerabili. Quando, invece, il numero di UFC è risultato inferiore a 150 UFC/25,8 cm² (Figura 6) i risultati ottenuti impiegando entrambi i metodi hanno mostrato maggiore aderenza tra loro. In un altro studio (Scott *et al.*, 1984), per livelli di contaminazione microbica bassi, il metodo delle piastre a contatto ha mostrato recuperi più elevati rispetto a quello del tampone; inoltre, l'uso del tampone ha consentito di rilevare con maggiore frequenza livelli di contaminazione superiori a 100 UFC/21-25 cm². Anche per Obee *et al.*, 2007, le piastre a contatto, rispetto al metodo tampone, hanno dimostrato una maggiore efficienza nel recupero di *Staphylococcus aureus* meticillina resistente.

Nelle indagini condotte su superfici ospedaliere asciutte, la tecnica delle piastre a contatto e quella che utilizza tamponi mostrano livelli di recupero microbico paragonabili (Galvin *et al.*, 2012). Le piastre a contatto sono più sensibili al recupero di batteri Gram-positivi rispetto a quello dei Gram-negativi (Lemmen *et al.*, 2001), ma non è chiaro se ciò sia dovuto alla maggiore sopravvivenza dei Gram-positivi sulle superfici asciutte. La metodica che utilizza tamponi risulta, invece, superiore a quella delle piastre nella rilevazione dei batteri Gram-negativi, come è stato confermato da uno studio effettuato, nell'arco di 22 mesi, in stanze di pazienti per la ricerca di *Staphylococcus aureus* meticillina resistente (MRSA), Enterococchi vancomicina resistenti (VRE) o batteri Gram-negativi multiresistenti (Lemmen *et al.*, 2001). Il recupero di batteri dalle superfici ambientali può essere anche influenzato dallo stato fisico dei batteri stessi, che possono essere stressati a causa dell'essiccazione o della mancanza di nutrienti (Wesche *et al.*, 2009).

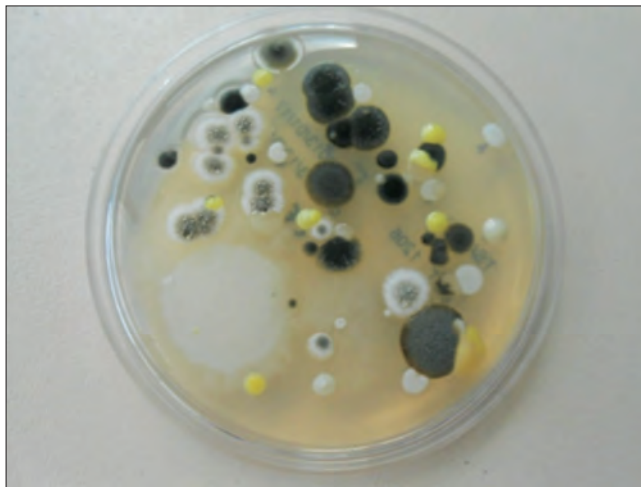


Figura 6 - Piastra Petri dopo incubazione

ATP bioluminescenza

La bioluminescenza è un fenomeno osservato in natura, ad esempio nelle lucciole *Photinus pyralis*. La biochimica di questa manifestazione naturale è conosciuta e studiata già da molto tempo ed è determinata dalla reazione tra l'enzima luciferasi, il suo substrato luciferina e la molecola adenosintrifosfato (ATP), utilizzata dalle cellule animali e vegetali per accumulare e scambiare energia. Considerando che una cellula danneggiata o morta non è più in grado di produrre ATP, la quantificazione di questa macromolecola può rappresentare un indice della presenza di cellule vive. L'utilizzo dell'ATP bioluminescenza prevede, per il campionamento, lo strofinamento di un tampone sulle superfici da analizzare (Carling e Bartley, 2010). I tamponi vengono ruotati continuamente, campionando in senso orizzontale e verticale. Normalmente il campionamento viene eseguito prima e dopo che la superficie è stata sanificata. Successivamente, il tampone è inserito in uno speciale tubo di reazione che viene agitato e poi "letto" mediante luminometro. La reazione di bioluminescenza si attiva con livelli di ATP estremamente bassi e la quantità di luce emessa è direttamente proporzionale alla quantità di ATP presente nel campione ed è espressa come numero di Unità di Luce Relativa (RLU).

L'analisi di bioluminescenza non permette di discriminare né il tipo né la specie di contaminante, ma di fatto può rapidamente fornire un'indicazione dei livelli di contaminazione, secondo alcuni autori paragonabile a un test di "conta totale" (Kyriakides *et al.*, 2010).

Dagli anni '80, la tecnica della ATP bioluminescenza è stata sempre di più adottata per monitorare il livello di pulizia delle superfici (Griffith *et al.*, 1997) in vari settori lavorativi. Negli ospedali, la tecnica consente di valutare il grado di inquinamento microbiologico presente sulle superfici delle strumentazioni e degli ambienti (Sherlock *et al.*, 2009; Dancer, 2009, Mulvey *et al.*, 2011; Anderson *et al.*, 2011).

Nel campo dell'HACCP, la possibilità di ottenere risultati validi in pochi minuti permette al metodo dell'ATP bioluminescenza di essere ampiamente usato per il monitoraggio ambientale (Davidson *et al.*, 1999; Marriott e Gravani, 2009).

La determinazione dell'ATP trova applicazione anche nell'industria farmaceutica (Ceresa, 2009). Negli ultimi anni, la possibilità di valutare in tempi rapidi e in modo accurato la presenza di un'eventuale contaminazione microbiologica è diventata, infatti, un'esigenza anche nel controllo di qualità della produzione di farmaci. Altre applicazioni del metodo si riscontrano nella cosmetica (ISS, 2013), nel monitoraggio dell'igiene degli impianti industriali e della qualità delle materie prime utilizzate in questi settori.

Confronto tra ATP bioluminescenza e tecniche di microbiologia classica

I metodi microbiologici classici presentano alcune limitazioni, che possono essere riassunte nei seguenti punti:

- l'attribuzione della formazione di ogni colonia cresciuta sul terreno a un solo microrganismo, in fase di calcolo delle UFC presenti nel campione in esame;

- la possibilità di enumerare la popolazione microbica solo quando il numero di colonie risulta compreso tra 0 e 200-300;
- i lunghi tempi necessari all'analisi, rispetto al momento del campionamento;
- l'elevata variabilità dei campioni microbiologici e dei risultati analitici (30-35%);
- la formulazione del giudizio su base sostanzialmente visiva (numero di colonie conteggiate) e pertanto legata alla "sensibilità" dell'occhio umano;
- lunghi tempi (5-7 giorni per l'enumerazione delle colonie su agar o 14 giorni e più per test di sterilità o di assenza patogeni) imposti dall'attesa che la colonia in crescita diventi visibile e pertanto numerabile.

Tra le variabili "biologiche" del campione che influiscono sul risultato analitico vanno incluse anche quelle dovute alla manipolazione del campione, agli operatori, ai materiali e ai terreni di coltura utilizzati, ecc.

La disponibilità di una tecnologia rapida in grado di fornire in tempo reale risultati sul livello di contaminazione offre la possibilità di una reazione tempestiva a eventuali deviazioni dalle condizioni standard di operatività. Inoltre, riduce i costi del controllo di qualità dei processi. L'ATP bioluminescenza può tuttavia essere considerato solo un metodo di *screening* iniziale (soprattutto per il settore alimentare) e deve essere integrato con indagini microbiologiche classiche (Davidson *et al.*, 1999; Dumingan *et al.*, 2012), non permettendo di rilevare la presenza di patogeni.

Molti studi hanno comparato i risultati ottenuti dai test microbiologici con il metodo dell'ATP bioluminescenza per analizzare il livello di pulizia delle superfici *in situ*. Secondo la Guida alle buone pratiche *Surveillance microbiologique de l'environnement dans les ES - CCLIN Sud-Ouest* (2016) l'ATP bioluminescenza può essere impiegata solo per indagini di *screening* e, pertanto, non è correlabile alle tecniche analitiche di tipo microbiologico. Altri studi hanno, invece, evidenziato una buona correlazione tra i risultati ottenuti con entrambe le metodiche (Bautista *et al.* 1996; Aycicek *et al.* 2006; Kyriakides *et al.*, 2010; Mulvey *et al.*, 2011; Amodio *et al.*, 2014; Azizkhan, 2014) e valori di contaminazione microbica < 2,5 UFC/cm² sono risultati associati a valori di RLU pari a 100, 250 e 500.

Altri autori, invece, hanno dimostrato una bassa correlazione tra questa metodica e le tecniche di microbiologia classica (Griffith *et al.*, 1997; Poulis *et al.*, 1993; White *et al.*, 2007; Sherlock *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2011). Infatti, in alcuni casi i livelli di ATP rilevati su superfici sono indicativi non solo della presenza di microrganismi ma anche di materiale biologico di origine animale o vegetale (ad esempio residui alimentari). Questo potrebbe spiegare la mancata corrispondenza tra i valori di RLU e quelli delle conte microbiche.

In una *review* sull'impiego dell'ATP bioluminescenza in ambienti sanitari (ospedali del Regno Unito) è emerso che i *benchmark* utilizzati per valutare il grado di pulizia delle superfici variavano da 100 a 500 RLU (Amodio e Dino, 2014); differenze di risultato possono essere imputabili al tipo di dispositivo utilizzato (Tabella 9).

Tabella 9 - Variabilità dei *benchmark* in relazione alla tipologia di dispositivo (ATP bioluminometro) impiegato (tratto da Amodio e Dino, 2014)

Authors, year [reference]	Setting	Samples/sites, number	ATP bioluminescence tool	ATP benchmark
Griffith et al., 2000 [11]	General hospital (UK)	31 sites ^a	Biotrace Cleantrace system (Biotrace Ltd.)	500 RLU/s
Ferreira et al., 2011 [15]	Philanthropic hospital (Brazil)	100 sites ^b	Clean-Trace ATP System (3M)	500 RLU/s
Boyce et al., 2010 [16]	500-bed university affiliated hospital (U.S.)	294 samples ^b	Clean-Trace ATP System (3M)	250 RLU/s
Willis et al., 2007 [17]	Three hospital wards (UK)	54 sites ^c	Hygiena system (Hygiena Int. Ltd.)	100 RLU/s
Anderson et al., 2011 [18]	District general hospital (UK)	44 sites ^c	SystemSure Plus system (Hygiena Int. Ltd.)	100 RLU/s
Cooper et al., 2007 [19]	Four acute hospitals (UK)	552 samples ^a 547 samples ^b	Biotrace Cleantrace system (Biotrace Ltd.)	500 RLU/s
Moore et al., 2010 [20]	Two central London teaching hospitals (UK)	400 samples ^a 400 samples ^b	Clean-Trace ATP System (3M)	250 RLU/s 500 RLU/s
Lewis et al., 2008 [21]	1300-bed teaching hospital (UK)	180 samples ^b	Biotrace Cleantrace system (Biotrace Ltd.)	250 RLU/s
Mulvey et al., 2011 [22]	Teaching hospital Glasgow (UK)	90 samples ^a 90 samples ^b	Hygiena system (Hygiena Int. Ltd.)	250 RLU/s
Sherlock et al., 2009 [23]	700-bed adult tertiary referral hospital (UK)	120 samples ^a 120 samples ^b	Biotrace Cleantrace system (Biotrace Ltd.)	500 RLU/s
Boyce et al., 2011 [25]	500-bed university affiliated hospital (U.S.)	500 sites ^a 500 sites ^b	Clean-Trace ATP System (3M)	250 RLU/s
Boyce et al., 2009 [27]	University affiliated community teaching hospital (U.S.)	510 samples ^a 503 samples ^b	Clean-Trace ATP System (3M)	250 RLU/s

^a Before daily cleaning.
^b After daily cleaning.
^c Not reported.

Metodo sponge-bag

La spugna, costituita da una striscia assorbente sterile contenuta in un sacchetto anch'esso sterile e facilmente richiudibile, si trova in commercio sia allo stato secco che già inumidita, pronta all'uso. Se allo stato secco, la spugna, prima di essere usata,

deve essere impregnata con una soluzione sterile peptonata, aggiunta nel sacchetto in quantità sufficiente a inumidirla, evitando però l'eccesso di liquido (in genere 7-8 ml di acqua peptonata). Quindi, la spugna viene manipolata dall'esterno in modo da essere inumidita uniformemente. Nell'estrarre la spugna dal sacchetto, prima dell'uso, si deve impedire il contatto con superfici esterne diverse da quelle da campionare, per evitare contaminazioni.

La spugna può essere impiegata sia per analisi quantitative che qualitative. Nel primo caso si ricorre all'utilizzo di delimitatori di area, monouso o reimpiegabili (in genere di un'area quadrata di 10 cm di lato - *Linee guida per il campionamento di superfici per analisi microbiologica* - IZSV 2015). Conoscendo l'estensione dell'area campionata e il volume complessivo di soluzione reidratante utilizzata, il risultato può essere espresso come UFC/cm² di superficie in esame.

Nel caso di analisi qualitative, la superficie oggetto del campionamento deve essere sufficientemente ampia, per permettere il recupero del maggior numero possibile di specie microbiche.

La spugna va strisciata, esercitando una pressione sulla superficie in esame, sia in senso orizzontale che verticale e, al termine del campionamento, ricollocata nel sacchetto originario, in cui viene aggiunto un volume noto di soluzione conservante. I campioni devono essere analizzati nel più breve tempo possibile, non oltre le 24 ore dal prelievo.

La metodica *sponge-bag* è molto utilizzata nel settore alimentare per la valutazione dello stato igienico delle superfici. Ad esempio, per la ricerca di *Salmonella* spp. e di *L. monocytogenes* su superfici di locali di sezionamento e insacco di macelli (insaccatrici, pozzetto di scolo, segaossa, coltelli, sterilizzatore di coltelli, tavolo locale sezionamento, tritacarne, ganci - Ripamonti *et al.*, 2002). L'utilizzo della spugna è stato validato anche per la rilevazione, il recupero e la quantificazione di spore vitali di *Bacillus anthracis* appositamente inoculate su superfici di acciaio, in simulazioni di contaminazione ambientale (Rose *et al.*, 2011).

Confronto tra *sponge-bag* e tampone

Il confronto è stato condotto nell'ambito di indagini effettuate nel settore carni, per la ricerca di *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. Ai fini della ricerca di *Salmonella* spp. sui macchinari utilizzati per la produzione di insaccati freschi il metodo *sponge-bag* risulta avere capacità di recupero maggiore; l'uso del tampone è, invece, più indicato per uno *screening* generale, quando si intendono monitorare contemporaneamente entrambe le specie batteriche in zone diverse di lavorazione (Ripamonti *et al.*, 2002). Mettendo a confronto i due metodi, gli autori sottolineano come, rispetto al metodo *sponge-bag*, l'utilizzo del tampone sia più economico e più pratico, perché di facile maneggiabilità e con bassa probabilità di inquinamento nel corso del prelievo, da parte dell'operatore. Con entrambi i metodi possono essere effettuate analisi sia qualitative che quantitative; queste ultime, però, con il metodo tampone risultano di più difficile standardizzazione.

Considerazioni conclusive

Nella tabella 10 si riportano le tecniche di campionamento microbiologico su superfici più comunemente utilizzate, con i relativi settori di maggiore impiego:

Tabella 10 - Prospetto riepilogativo delle tecniche più comunemente utilizzate per il controllo della contaminazione microbiologica nei vari settori lavorativi

	Piastre a contatto	Tamponi sterili	Sponge-bag	ATP bioluminescenza
Ambienti sanitari	X	X		X
Sale autoptiche	X	X		
<i>Clean room</i>	X			
Industria farmaceutica	X			X
Industria Cosmetica				X
Settore Alimenti	X			
		X	X	X
<i>Indoor</i>				
Ambienti domestici	X			
Biblioteche e archivi	X	X		
Indumenti da lavoro	X			
Sistemi di protezione personale	X			
DPI (guanti)	X			
Modelli tecnologici di superfici	X			

La valutazione del livello di pulizia delle superfici, inizialmente, veniva condotta ricorrendo a criteri soggettivi e a valutazioni visive, coadiuvate dalla compilazione di appositi questionari. È noto, però, che una superficie visivamente pulita può non essere tale dal punto di vista microbiologico. L'osservazione visiva può tuttavia contribuire alla valutazione dello stato igienico ambientale. In uno studio condotto da Malik *et al.* (2003) la valutazione dell'efficacia degli interventi di pulizia in ambienti sanitari del Regno Unito è stata effettuata attraverso audit visivi su superfici selezionate in base al rischio di contaminazione, congiuntamente all'effettuazione di test rapidi per valutare il livello igienico ambientale (ATP bioluminescenza e piastre a contatto). L'esame visivo è stato condotto avvalendosi di *check list* incentrate sulle tematiche riportate in Tabella 11:

Tabella 11 - Aree tematiche oggetto di valutazione negli audit visivi del livello di pulizia delle superfici (tratto da Malik *et al.*, 2003)

Section	Topic area
A	<i>Documentation and management of cleaning</i>
B	<i>Risk in relation to cleaning design</i>
C	<i>Targets</i>
D	<i>Training and education of staff involved in cleaning</i>
E	<i>Equipment, consumables, and disinfectants used in cleaning</i>
F	<i>Personal protective clothing/uniform</i>
G	<i>Substances hazardous to health</i>
H	<i>Cleaning storeroom/equipment</i>
I	<i>Hospital cleaning contracts/cleaning hygiene and allied support services contracts</i>
J	<i>Collaborative approach to environmental cleanliness</i>
K	<i>Routine cleaning of clinical and public areas</i>
L	<i>Terminal cleaning of patient areas</i>
M	<i>Routine cleaning of isolation room/source isolation room</i>
N	<i>Management of high-risk soilage</i>
O	<i>Cleaning during building, upgrading, and demolition work in health care premises</i>
P	<i>Personal hygiene</i>

Il giudizio igienico è stato espresso secondo i criteri riportati in Tabella 12.

Tabella 12 - Criteri di interpretazione dei risultati (tratto da Malik et al., 2003)

Assessment of cleanliness	Result	Interpretation
Percentage sites visually clean	>70%	Acceptable
	60% - 69%	Marginal acceptable
	<59%	Unacceptable
ATP bioluminescence	<500 RLU	Acceptable
	>500 RLU	Unacceptable
RODAC dip slides	<2,5 CFU/cm ²	Acceptable
	>2,5 CFU/cm ²	Unacceptable

Negli ultimi decenni, avvalendosi della disponibilità di metodiche di campionamento e analisi specifiche e di semplice utilizzo, la comunità scientifica ha cercato di fornire indicazioni quanto più possibile oggettive e univoche riguardo la valutazione dello stato igienico delle superfici.

Nell'ambito dei metodi microbiologici classici, la tecnica delle piastre a contatto risulta la più semplice e facilmente standardizzabile mediante l'utilizzo di applicatori opportuni, anche se non priva di limitazioni, prima tra tutte i lunghi tempi di attesa tra campionamento e risultati dell'analisi. In presenza di superfici irregolari è opportuno integrarne l'impiego con l'uso di tamponi; in caso di necessità di risultati immediati - per la gestione rapida di eventuali deviazioni dalle condizioni operative standard - o per finalità di HACCP è possibile utilizzare l'ATP bioluminescenza, previa successiva conferma del risultato attraverso indagini che si avvalgano di metodologie proprie della microbiologia classica.

In definitiva, la letteratura dimostra ancora scarsa uniformità di utilizzo delle varie metodiche disponibili nei diversi contesti lavorativi, probabilmente indice della difficoltà di impiego di una stessa metodica in tutti i contesti di interesse.



5. Virus e ambienti di lavoro

Annalaura Carducci e Marco Verani, *Università di Pisa, Dipartimento di Biologia, Laboratorio di Igiene e Virologia Ambientale*

I virus rappresentano un potenziale pericolo per la salute dei lavoratori, a causa delle loro elevate resistenze ai fattori ambientali e ai trattamenti di disinfezione anche prolungati nel tempo, per la loro bassa carica infettante e per la capacità di diffondersi attraverso molteplici vie di trasmissione. Inoltre, l'elevata variabilità genetica e la possibilità di ricombinazione comporta l'eventualità di origine di nuovi agenti virali in grado di innescare problemi sanitari imprevisti, come ad esempio si è avuto con la SARS (*Severe Acute Respiratory Syndrome*).

Numerose evidenze bibliografiche (Tabella 13) dimostrano la presenza di agenti virali caratterizzati da molteplici vie di trasmissione (aerea, ematica e oro-fecale) in ambienti lavorativi sia sanitari che non (Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2012). Epidemie legate a norovirus hanno interessato strutture di assistenza, navi da crociera (Isakbaeva *et al.*, 2005), scuole, asili nido (CDC 2008; CDC 2009), ristoranti, alberghi (Domenech-Sanchez *et al.*, 2011), diversi centri di addestramento militare (Mayet *et al.*, 2011). L'importanza dei virus quali agenti di rischio in diversi ambienti di lavoro è stata confermata, oltre che da evidenze epidemiologiche, anche dai risultati di monitoraggi microbiologici. Il rilevamento virale su una grande varietà di superfici (ad esempio le maniglie delle porte, le ringhiere per scale, le maniglie sui servizi igienici, i giocattoli, i telefoni, le tazze, i tessuti) (Gallimore *et al.*, 2008) ha contribuito a spiegare la modalità di trasmissione epidemica.

Tabella 13 - Principali agenti virali rilevati in differenti ambienti di lavoro

Ambiente di lavoro	Virus	Riferimenti bibliografici
Impianti di depurazione	Enterovirus	Carducci <i>et al.</i> , 1995, 2000
	Coxsackievirus B	Pfirschmann, 1994
	Echovirus	Clark <i>et al.</i> , 1981
	Reovirus	Casini <i>et al.</i> , 2001
	Adenovirus	Carducci <i>et al.</i> , 2009
Impianti di smaltimento rifiuti solidi	HAV	Clark <i>et al.</i> , 1981
	Norovirus	Okoh <i>et al.</i> 2010
	Adenovirus	Carducci <i>et al.</i> , 2009
Ambulatori dentistici e laboratori ospedalieri	Adenovirus	Gallimore <i>et al.</i> , 2008;
	Norovirus	Gallimore <i>et al.</i> , 2008;
	Torque Teno Virus	Carducci <i>et al.</i> , 2011
	Astrovirus	Gallimore <i>et al.</i> , 2008
	Rotavirus	Ganime <i>et al.</i> , 2012
Stanze degenza ospedaliera	HBV	Piazza <i>et al.</i> , 1987
	HCV	Carducci <i>et al.</i> , 2002
	Rotavirus	Soule <i>et al.</i> , 1999
	SARS-CoV	Wong, 2004
	Torque Teno Virus	Verani <i>et al.</i> , 2014
	Adenovirus	Verani <i>et al.</i> , 2011

Vie di trasmissione

Molti agenti biologici possono avere più di una via di trasmissione: per esempio, è dimostrato come rinovirus possa essere trasmesso sia per via aerea che per contatto con superfici contaminate e come ciò possa influire sull'infettività virale (Couch *et al.*, 1966). Le vie di trasmissione possono essere semplici, come nel caso dell'inalazione diretta di aerosol contenente il patogeno o estremamente complesse e coinvolgere diverse matrici ambientali. Per esempio, gli enterovirus in uscita da un impianto di depurazione delle acque reflue possono arrivare a contaminare le acque del mare, depositarsi sui sedimenti del fondale e, dopo molto tempo, essere catturati dagli apparati filtratori dei molluschi, che poi potranno essere pescati e consumati dall'uomo. La trasmissione dei patogeni può, perciò, avvenire anche su lunghe distanze.

Superfici

Il coinvolgimento delle superfici nella trasmissione delle malattie era stato già rico-

nosciuto molto tempo prima dell'identificazione degli agenti patogeni, quando nel 1908 le epidemie di vaiolo vennero collegate alle importazioni di cotone.

Sono molti gli studi che attestano la possibilità di rinvenire virus su superfici e oggetti di uso comune in luoghi pubblici, come uffici e ospedali (Keswick *et al.*, 1983). Patogeni enterici sono stati ritrovati su superfici (giocattoli, maniglie) di asili (Keswick *et al.*, 1983), mense (d'Souza *et al.*, 2006; Okabayashi *et al.*, 2008) e in altri luoghi pubblici (Gallimore *et al.*, 2008). Le superfici possono essere contaminate direttamente dal contatto con sangue, vomito, feci o altre secrezioni corporee infette o, indirettamente, attraverso aerosol o altri oggetti contaminati. Una volta che una superficie è contaminata, essa può facilmente fungere, a sua volta, da sorgente di contaminazione per altri oggetti animati e inanimati, come mani e strumenti di lavoro (Ansari *et al.*, 1991; Gwaltney *et al.*, 1978; Okabayashi *et al.*, 2008). In uno studio di Rheinbaben (2000) è stato dimostrato che fino a 14 persone possono essere contaminate semplicemente toccando la maniglia di una porta sulla quale vi è presenza virale ed è possibile seguire la successiva trasmissione, da queste ad altre persone, fino al 6° contatto. Inoltre, è stato riscontrato che, attraverso le mani, possono essere contaminate fino a 7 differenti superfici (Barker *et al.*, 2004).

Non è, comunque, facile dimostrare il ruolo delle superfici nella trasmissione virale, anche se numerose sono le prove a favore (Tabella 14):

- Le superfici possono essere contaminate direttamente o indirettamente;
- La maggior parte dei virus enterici e respiratori è in grado di sopravvivere su superfici animate e inanimate per tempi variabili;
- Il trasferimento di virus dalle mani alle superfici e viceversa è possibile;
- La disinfezione delle superfici è in grado di ridurre o di interrompere le catene di trasmissione.

Tabella 14 - Evidenze della trasmissione di alcuni dei virus maggiormente diffusi nella popolazione attraverso superfici

Virus	Famiglia	Trasmissione tramite oggetti o superfici contaminate
Rotavirus	Reoviridae	Riconosciuta (Ansari <i>et al.</i> , 1988)
Norovirus	Caliciviridae	Evidenze sperimentali a favore (Boxman <i>et al.</i> , 2009)
Adenovirus	Adenoviridae	Non dimostrata
Enterovirus	Picornaviridae	Non dimostrata
Virus dell'Epatite A	Picornaviridae	Riconosciuta (Boone <i>et al.</i> , 2007)
RSV	Paramixoviridae	Riconosciuta (Boone <i>et al.</i> , 2007)
Influenza virus A e B	Ortomixoviridae	Riconosciuta, ma considerata secondaria (Boone <i>et al.</i> , 2007)
Virus parainfluenzale	Paramixoviridae	Non dimostrata (Boone <i>et al.</i> , 2007)
Rhinovirus	Picornaviridae	Riconosciuta (Gwaltney <i>et al.</i> , 1978)

Fattori di sopravvivenza dei virus sulle superfici

Le caratteristiche più importanti da tenere presente per valutare la resistenza ambientale dei virus, riassunte per alcuni di essi nella Tabella 15, sono di tipo "biologico". L'assenza di *envelope* conferisce ai virus una maggiore resistenza all'essiccamento, rendendoli più stabili nell'ambiente. Virus privi di *envelope*, come per esempio i rotavirus, sono in grado di restare infettivi su una superficie fino a 2 mesi (Vasickova *et al.*, 2010), mentre virus dotati di *envelope*, come per esempio i virus respiratori, generalmente restano infettivi per ore o al massimo giorni (Duizer *et al.*, 2004). Si possono riscontrare profonde differenze per quanto riguarda la resistenza a vari fattori anche tra virus appartenenti alla stessa famiglia. Per esempio, norovirus è estremamente più resistente del feline calicivirus a valori estremi di pH (Duizer *et al.*, 2004). L'umidità relativa è uno dei parametri più influenti sulla sopravvivenza dei virus. Sembra che i virus privi di *envelope* sopravvivano meglio in ambienti con umidità > 80%, mentre virus con *envelope* sopravvivono meglio in ambienti in cui l'umidità è < 50% (Vasickova *et al.*, 2010). In generale, si può affermare che virus con più alto contenuto lipidico tendono a essere più resistenti in condizioni di bassa umidità (Mocé-Llivina *et al.*, 2006). Le eccezioni a questa regola non sono però infrequenti. Sui rotavirus si hanno notizie contrastanti: Sattar (1986) ha riportato che rotavirus sopravvive per un periodo limitato in ambienti con umidità relativa elevata; secondo Abad (1994) rotavirus e poliovirus mostrano elevata persistenza in condizioni di umidità elevata su matrici non porose, mentre adenovirus sembra non essere influenzato da cambiamenti di umidità.

La temperatura influenza in maniera diversa ogni tipo di virus, anche se in linea di massima è possibile affermare che i virus possono persistere nell'ambiente in un ampio *range* di temperature e possono essere preservati per lunghi periodi con il congelamento (Cliver, 2009; Yeargin *et al.*, 2016).

La temperatura è uno dei principali parametri da tenere in considerazione quando si parla di norovirus, che sembra sopravvivere più a lungo a basse temperature (Duizer *et al.*, 2004); infatti, le epidemie avvengono più frequentemente in inverno che non in estate.

I raggi ultravioletti rappresentano degli efficaci agenti virucidi. I virus a singolo filamento di acido nucleico sono più suscettibili di quelli a doppio filamento (Gerba *et al.*, 2002). Basandosi sull'analisi eseguita da Simonet e Gantzer (2006) su quattro diversi virus a RNA (poliovirus 1, fago MS2, fago GA, fago Q β) è stato dimostrato che il tasso di degradazione dell'RNA dipende in particolare dalle dimensioni del genoma: più grande è il genoma, maggiore sarà la sensibilità ai raggi UV.

Un altro fattore in grado di influenzare la sopravvivenza dei virus è il tipo di superficie che si considera. La maggior parte dei virus resta infettiva più a lungo su superfici non porose, anche se ci sono delle eccezioni come poliovirus e adenovirus, che sembrano resistere più a lungo su materiali porosi come carta e cotone, in confronto a materiali non porosi come alluminio, lattice, piastrelle smaltate (Boone *et al.*, 2007). Alcune superfici hanno attività virucida: adenovirus e poliovirus persistono per un tempo più breve sull'alluminio rispetto ad altre superfici non porose (Abad *et al.*, 1994).

La sopravvivenza virale aumenta all'aumentare dello stato o meno di adsorbimento sulla superficie. Generalmente le particelle virali immobilizzate sulle superfici mantengono più a lungo la loro infettività (Vasickova *et al.*, 2010). Matrici organiche possono stabilizzare e proteggere i virus, facendoli persistere più a lungo sulle superfici (Boone *et al.*, 2007).

Il pH sembra giocare soltanto un ruolo minore sulla sopravvivenza dei virus in ambienti chiusi. È stato dimostrato che norovirus può sopravvivere più di 3 ore a temperatura ambiente a un pH di 2,7 (Duizer *et al.*, 2004). Variazioni nel pH determinano riarrangiamenti delle cariche superficiali delle particelle virali, provocando così modifiche nello stato di adsorbimento alle superfici.

Tabella 15 - Persistenza di alcuni virus su superfici secche inanimate (da Kramer *et al.*, 2006)

Virus	Durata della persistenza
Adenovirus	7 giorni - 3 mesi
Coronavirus	3 ore
HAV	2 ore - 60 giorni
Rotavirus	6 - 60 giorni
Coxsackievirus	> 2 settimane
HBV	> 1 settimana
Norovirus	8 ore - 7 giorni
Poliovirus 1	4 ore - < 8 giorni
Rinovirus	2 ore - 7 giorni

Il monitoraggio virologico ambientale delle superfici

Per valutare e controllare il rischio virale sulle superfici degli ambienti lavorativi può essere utile effettuare prelievi e determinazioni analitiche che consentano di stimare l'esposizione e le vie di diffusione di questi agenti biologici e che permettano, inoltre, di verificare l'efficacia degli interventi preventivi intrapresi e delle misure collettive per il contenimento della diffusione ambientale, la capacità di isolamento delle misure individuali e la loro corretta applicazione nella routine lavorativa.

La scelta dei virus da ricercare richiede un attento studio preliminare delle possibili vie di diffusione e di infezione di tali agenti in funzione delle attività lavorative sottoposte a esame e delle procedure a rischio svolte dai lavoratori. Non è ragionevole ipotizzare la ricerca di tutti i virus patogeni, sia per il numero degli agenti da rilevare, sia in relazione alle difficoltà tecniche spesso insite nella loro rilevazione e ai conseguenti costi economici da sostenere. Gli agenti virali da ricercare debbono, quindi, essere scelti sulla base di attente valutazioni della loro rappresentatività nei confronti dei pe-

ricoli individuati, a seconda del tipo di attività lavorativa e delle esposizioni previste. Risulta, inoltre, indispensabile definire attendibili indicatori di contaminazione, che presentino una chiara relazione con la presenza virale e siano contraddistinti da analogia resistenza ai vari trattamenti di disinfezione. Gli indicatori dovranno essere facilmente individuabili analiticamente, anche nell'ambito di laboratori non specialistici.

Aspetti analitici

La ricerca di virus su superfici ambientali risulta notevolmente più complessa di quanto si verifichi con i campioni di derivazione clinica in relazione a diversi aspetti, tra cui la maggiore eterogeneità dei materiali esaminati, spesso contenenti sostanze interferenti. La virologia ambientale si avvale, quindi, di procedure specifiche che consistono di tre momenti fondamentali, strettamente collegati tra loro: il prelievo, la preparazione del campione e l'analisi vera e propria (Bosch *et al.*, 2010; Wyn-Jones *et al.*, 2011). Per i prelievi da superfici e la preparazione del campione sono disponibili diversi protocolli pubblicati, in alcuni casi comparati tra loro (Wu *et al.*, 2005; Gallimore *et al.*, 2006; Boxman *et al.*, 2009; Scherer *et al.*, 2009; Julian *et al.*, 2011). In generale, il campionamento è effettuato tramite l'utilizzo di tamponi o spugnette imbevute di varie soluzioni, piastre da contatto o membrane di nitrocellulosa sottoposte a successiva eluizione: studi comparativi non hanno dimostrato però relazioni significative tra le diverse tecniche utilizzabili. L'efficienza dei metodi dipende dalle proprietà chimico-fisiche della superficie in esame e dal tipo di virus da rilevare e risulta maggiore quando il campionamento è effettuato su superfici non porose e lisce, come acciaio, metallo, ceramica, vetro. I campioni vengono successivamente eluiti e gli eluati analizzati mediante metodi di rilevazione che possono essere classificati in due tipologie principali:

- colturali (utilizzo di colture cellulari);
- non colturali, soprattutto biomolecolari e, in particolare, di amplificazione genica sia qualitativa che quantitativa (PCR e *Real Time*-PCR).

Le tecniche colturali implicano la vitalità del virus e la sua replicabilità in colture cellulari adatte. La replicazione consente di avere a disposizione quantità consistenti dell'agente virale isolato, per approfondire l'identificazione fino alla definizione di ceppo e poter, quindi, ricostruire i percorsi di diffusione ambientale seguiti dal virus attraverso i vari materiali. La linea cellulare da utilizzare viene scelta in relazione al tipo di virus che si intende isolare dal campione, in quanto ogni virus cresce preferenzialmente su determinate linee, ma non su tutte. Tuttavia, poiché non esiste una linea cellulare in grado di rilevare con la stessa efficienza tutti i virus, la soluzione tecnica migliore sarebbe quella di utilizzare almeno due linee cellulari che si complementino tra loro. La comparsa di un effetto citopatico, indice di replicazione virale, dipende dalla concentrazione di virus nel campione e dalle proprietà dello stesso virus. Tale effetto deve, tuttavia, essere confermato con almeno altre due subcolture, per essere certi che esso sia dovuto alla azione virale e non alla tossicità intrinseca

dell'eluato. Inoltre, mentre la crescita su cellule con il conseguente effetto citopatico è un sicuro indice di infettività delle particelle virali isolate, non è sempre vero il contrario, poiché esistono virus capaci di indurre infezioni persistenti croniche senza produrre un evidente effetto citopatico. La semplice osservazione di un effetto citopatico, tuttavia, non consente di identificare con precisione l'agente isolato, in quanto la crescita di una grande quantità di specie virali con caratteristiche biologiche diverse sulle cellule può dare origine a fenomeni di interferenza (ad esempio fra enterovirus e reovirus), con mascheramento di infezioni multiple o effetti citopatici difficili da interpretare senza una successiva identificazione (Carducci *et al.*, 2002). Tale identificazione può anche comportare notevoli difficoltà e richiedere tecniche diverse e spesso di non facile esecuzione, oltre che costose. Vi è poi da rilevare come l'analisi colturale non sempre risulti possibile per la non coltivabilità di alcune tipologie di virus (virus dell'epatite E, norovirus).

Fra le tecniche di biologia molecolare, la reazione a catena della polimerasi (PCR) è sicuramente una delle più sensibili e più utilizzate per la ricerca di virus nell'ambiente. Tale metodica richiede tempi brevi (5-6 ore) ed è in grado di identificare diversi agenti in uno stesso campione senza risentire, a differenza delle colture cellulari, del fenomeno dell'interferenza virale. Uno dei problemi fondamentali conseguenti all'applicazione della PCR in campo ambientale è tuttavia la possibile presenza di sostanze (acidi umici e fulvici) capaci di interferire chimicamente o stericamente con la rilevazione. Inoltre, poiché la maggior parte dei virus presenti nell'ambiente è a RNA, è necessaria la messa a punto di metodi di estrazione degli acidi nucleici che siano in grado di purificare il campione dalla presenza delle ribonucleasi. Quindi l'applicazione di questa tecnica richiede sempre una fase di messa a punto e di validazione. Devono essere sempre previsti controlli positivi o negativi e la conferma dei risultati con sequenziamento: ciò permette anche l'identificazione a livello di ceppo e rende, quindi, possibili analisi filogenetiche e studi di epidemiologia molecolare. Nella realtà analitica odierna, con la *real time* PCR è possibile quantificare i virus anche in matrici ambientali; inoltre, con *multiplex* PCR e *microarrays*, si può procedere alla ricerca di virus diversi in contemporanea: si deve però considerare che l'applicazione di tali metodi per attività analitiche routinarie non risulta tuttora proponibile per i relativi risvolti economici. Essi presentano comunque un limite: i virus ritrovati nell'ambiente con saggi non colturali potrebbero non essere vitali e, quindi, non rappresentare un rischio immediato per il lavoratore. Tuttavia, l'evoluzione delle tecniche di rilevazione con conseguente aumento della specificità e della sensibilità, possono portare all'utilizzo dei dati ottenuti in ottica di valutazione quantitativa del rischio microbico, normalmente conosciuta con l'acronimo della dizione inglese QMRA (*Quantitative Microbial Risk Assessment*). Tale approccio è stato recentemente attuato per la stima del rischio di infezione da adenovirus umano in differenti ambienti di lavoro (impianti di depurazione delle acque reflue, impianti di smaltimento rifiuti solidi, ambienti ospedalieri e uffici) (Carducci *et al.*, 2016).



6. Valori di riferimento relativi alla contaminazione microbica delle superfici

Di seguito viene illustrato nel dettaglio quanto è stato reperito dalla letteratura in merito alla valutazione quantitativa dei livelli di contaminazione microbica rinvenuti sulle superfici.

Va premesso innanzi tutto che non esistono standard o riferimenti normativi, né sono stati reperiti lavori in cui siano proposti valori indicativi o "indici" di riferimento come per la contaminazione aerodispersa (Dacarro *et al.*, 2000; *European Collaborative Action*, 1993).

La maggior parte dei lavori reperiti in letteratura, inoltre, riporta valori finalizzati a valutare l'efficacia delle azioni di sanificazione condotte. Altri, infine, pur riferendosi ai protocolli di pulizia adottati, indicano termini di accettabilità delle condizioni esistenti: ad essi si farà riferimento di seguito.

Nelle tabelle che seguono, suddivise per settore lavorativo, sono indicate le metodiche utilizzate per l'analisi microbiologica delle superfici, i valori di riferimento proposti dai vari autori (talvolta mutuati da altre fonti) e l'eventuale riferimento a specifici indicatori di contaminazione. Le metodiche utilizzate dai vari autori risultano essere molteplici (per i dettagli si rimanda al Capitolo 4): questo, se da un lato permette di valutare approcci diversi al problema, ciascuno con i suoi pro e i suoi contro, dall'altro indubbiamente contribuisce a creare disomogeneità operativa, rendendo difficoltoso il confronto tra i risultati dell'analisi bibliografica. Tra gli aspetti non sempre omogenei vi è anche la temperatura e il tempo di incubazione dei campioni microbiologici raccolti, fattori che possono influire sul risultato analitico finale. Per questo motivo nelle tabelle seguenti sono state evidenziate, quando disponibili, le condizioni operative adottate dagli autori relativamente a questi due parametri.

La contaminazione microbiologica delle superfici negli ambienti lavorativi

Tabella 16 - Settore sanitario-farmaceutico

Ambiente	Metodo	Valori di riferimento	Microorganismi indicatori	Riferimenti bibliografici	Fonti dei limiti	
Sale operatorie e altri ambienti critici (sale per esami invasivi in cavità sterili ecc.)	Piastrine a contatto	<p>≤ 5 UFC/piastra.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Se 5 < UFC/piastra < 15: accettabile; - UFC/piastra > 15 in 1 solo punto: rivedere il protocollo di pulizia e la sua attuazione; - UFC/piastra > 15 in 5 o più punti: inaccettabile, ripetere il controllo 	<p>Se presenti <i>S. aureus</i>, enterobatteri, <i>Aspergillus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., rivedere interamente il protocollo di pulizia e programmare nuovi controlli</p>	Linee Guida sugli standard di sicurezza e di igiene del lavoro nel reparto operatorio, ISPESL dic. 2009	C.Clin-Ouest: recommandations pour les controles d'environnement dans les etablissements de santé. (ottobre 1999)	
		<p>≤ 50 UFC/piastra.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Se > 50 UFC/piastra: rivedere il protocollo di sanificazione 	<p>Assenza di agenti patogeni: <i>S. aureus</i>, enterobatteri, <i>Aspergillus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp.</p>			
Degenza pre/post intervento, Rianimazione, Neonatologia	Piastrine a contatto 55mm MSA 37°C per 48 h conta microbica totale (ACC)	≤ 2,5 UFC/cm ²	Assenza di <i>S. aureus</i>	Amodio <i>et al.</i> , 2014		
		ATP bioluminescenza				< 100 RLU
		Tamponi conta microbica totale (ACC)				< 2,5 UFC/cm ²
Ospedali	ATP bioluminescenza	< 250 RLU				

Segue: Tabella 16 - Settore sanitario-farmaceutico

Ambiente	Metodo	Valori di riferimento	Microorganismi indicatori	Riferimenti bibliografici	Fonti dei limiti
	Dipslides 30°C per 48h conta microbica totale (ACC)	< 2,5 UFC/cm ²	Patogeni < 1 UFC/cm ² <i>S. aureus</i> meticillina resistente (MRSA) e MSSA	Mulvey <i>et al.</i> , 2011	
	ATP bioluminescenza	< 100 RLU			
	conta microbica totale (ACC)	< 5 UFC/cm ²	<i>S. aureus</i> , incluso MRSA, <i>Clostridium difficile</i> , Enterococchi vancomicina resistenti, <i>Salmonella</i> e <i>Aspergillus</i> < 1 UFC/cm ²	Dancer, 2004	Malik <i>et al.</i> , 2003
Settore 1: rischio minimo (uffici).		< 5 UFC/cm ²	<i>Aspergillus fumigatus</i> :		
	Piastre a contatto (CBT 37°)	< 2 UFC/cm ²	<ul style="list-style-type: none"> Settori con filtri HEPA: Obiettivo 0 UFC/6 punti di prelievo; allerta 1 UFC; 		
		< 0,2 UFC/cm ²	<ul style="list-style-type: none"> Settori senza filtri HEPA: Obiettivo 5 UFC/camera 	Beaucaire <i>et al.</i> , 2001	Guide du bionettoyage n. 5670 ARECLIN
Settore 3: rischio alto (terapia intensiva, pediatria, urgenza, rianimazione, radiologia...).					

La contaminazione microbiologica delle superfici negli ambienti lavorativi

Segue: Tabella 16 - Settore sanitario-farmaceutico

Ambiente	Metodo	Valori di riferimento	Microorganismi indicatori	Riferimenti bibliografici	Fonti dei limiti
Settore 4: rischio molto alto (blocco operatorio, neonatologia, pronto soccorso, oncologia ...).		< 0,2 UFC/cm ²			
Settore 1 Settore 2 Settore 3 Settore 4		Batteri totali < 5 UFC/cm ² Batteri totali < 2 UFC/cm ² Batteri totali < 0,2 UFC/cm ² Batteri totali < 0,2 UFC/cm ²			Recomand. ARECLIN Recomand. ASPEC
Zone alto rischio	Piastra a contatto 24 cm ² (con pressione pari a 500 gr)	UFC per piastra: batteri: 25, 10, 5 funghi: 1, 1, <1 (valore di azione, allerta, obiettivo)		Assistance Publique Hopitaux de Paris. Guide de recommandation des bonnes pratiques - Tomo 2 parte 1, 2, 3 2004	
Zone a rischio molto alto		UFC per piastra: batteri: 10, 5, <1 funghi: 1, 1, <1 (valore di azione, allerta, obiettivo)			
Unità di terapia intensiva	Tamponi		<i>Staphylococcus aureus</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>A. baumannii</i>	Huang <i>et al.</i> , 2013	

Segue: Tabella 16 - Settore sanitario-farmaceutico

Ambiente	Metodo	Valori di riferimento	Microorganismi indicatori	Riferimenti bibliografici	Fonti dei limiti
Ambulatori chirurgici INAIL	Tamponi su area circolare di 1cm ² CBT 37°C per 72h CMT 28°C per 72h	CBT (conta batterica totale): accettabile 0 UFC/cm ² ; dubbia 1-5 UFC/cm ² ; alterata >5 UFC/cm ² CMT (conta micetica totale): accettabile 0 UFC/cm ² ; dubbia 1-3 UFC/cm ² ; alterata > 3 UFC/cm ²	Enterobatteri e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> accettabile 0-2 UFC/cm ² alterata >3 UFC/cm ²	Catamo <i>et al.</i> , 1999	Fisher <i>et al.</i> , 1972; Pitzurra, 1980 e 1982; Zamuner, 1984; Bellocchi e Quagliarini, 1995
Ambulanze	Tamponi 37°C per 48h	< 5 UFC/cm ²		Luksamijarulkul e Pipitsangjan, 2015	
Assistenza sanitaria permanente (ad es. assistenza domiciliare) o occasionale (ad es. assistenza al parto)	NOTA: Riguarda la contaminazione delle mani e non delle superfici		Stafilococchi, <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Klebsiella</i> spp. e <i>Acinetobacter</i> spp.	WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care - 2009	
Studi dentistici	Tamponi per 30" CBT 36°C per 48h	≤ 1 UFC/cm ²		Castiglia <i>et al.</i> , 2008	Pitzurra <i>et al.</i> , 1997
	Piastre a contatto 36°C per 48h	Bancone di lavoro: accettabile: ≤ 0,64 UFC/cm ² allerta: 1,48 UFC/cm ²		Pasquarella <i>et al.</i> , 2012	

La contaminazione microbiologica delle superfici negli ambienti lavorativi

Segue: Tabella 16 - Settore sanitario-farmaceutico

Ambiente	Metodo	Valori di riferimento	Microorganismi indicatori	Riferimenti bibliografici	Fonti dei limiti
		Interruttori: accettabile: 0,63 UFC/cm ² allerta: 1,31 UFC/cm ²			
Stabulari	ATP bioluminescenza			Ednie <i>et al.</i> , 1998	APHA, 1970 (si tratta del limite di accettabilità per pavimenti di stanze ospedaliere)
	Piastre a contatto, pre e post sanificazione	50 UFC/piastra			
		Classe A1 (pareti e sedie): < 1 UFC/piastra			
		Classe B1: (pareti) < 5 UFC/piastra e (sedie) < 10 UFC/piastra			
		Classe B2: (pareti) < 5 UFC/piastra; (sedie) < 10 UFC/piastra	<i>Staphylococcus</i> , <i>Micrococcus</i> e <i>Bacillus</i> spp. <i>Candida</i> spp.	Ashour <i>et al.</i> , 2011	Federal Standard 209E (USA)
Farmaceutico (Clean room)	Piastre RODAC 30°C - 35°C per 48h poi 20°C - 25°C per 72h	Classe C: (pareti) < 25 UFC/piastra Classe C: (pavimenti) < 50 UFC/piastra			

Segue: Tabella 16 - Settore sanitario-farmaceutico

Ambiente	Metodo	Valori di riferimento	Microorganismi indicatori	Riferimenti bibliografici	Fonti dei limiti
		Classe D1: (pareti e pavimenti) < 50 UFC/piastra			
		Classe D2: (pareti e pavimenti) < 50 UFC/piastra			
	Tamponi	Classe A2: < 1 UFC/tampone			
Farmaceutico	Piastre a contatto	Gradi di sterilità da A a D. Superfici: A < 1 UFC/piastra, B < 5 UFC/piastra, C < 25 UFC/piastra, D < 50 UFC/piastra Guanti (5 dita): A < 1 UFC/guanto, B < 5 UFC/guanto		European Commission Guidelines to Good Manufacturing Practice EC GMP, 2008	
	Piastre a contatto CBT 37° per 24h poi T amb. per 48h	Valori distinti per zone*: Zona 1 < 5 UFC/cm ² Zona 2 < 2 UFC/cm ² Zona 3 < 0,2 UFC/cm ² Zona 4 < 0,2 UFC/cm ²		Guide du Bionettoyage, Commission Centrale des Marchés 1990	

*Zona 1: Amministrazione, sala riunioni, servizio tecnico, scale, luoghi di circolazione, ascensori, sala d'attesa, ricevimento delle materie prime e confezionamento (imballaggio) primario.
 Zona 2: Preparazione, lavorazione e confezionamento dei prodotti non sterili, passaggi di accesso alle zone.
 Zona 3: Locali di sperimentazione non sterili, distribuzione delle preparazioni da sterilizzare nel recipiente finale e chiusura del recipiente, sterilizzazione, passaggi di accesso alla zona 4, spogliatoi, servizi igienici, docce.
 Zona 4: Locali di sperimentazione sterile, prelievi; manipolazione delle materie prime sterili, Fasi asettiche: fabbricazione, distribuzione, chiusura del recipiente.

Di seguito si specificano dettagli interessanti per il presente lavoro tratti dai dati di letteratura presentati in tabella, per una maggiore comprensione degli stessi.

La presenza di una carica batterica $< 2,5$ UFC/cm² su superfici ospedaliere, quali letti, sedie, tavoli, arredi vari e l'assenza di *S. aureus* (considerato come organismo indice della contaminazione da patogeni), sono stati ritenuti da alcuni autori parametri utili ai fini della valutazione del rischio di infezione (Amodio *et al.*, 2014). Lo stesso conteggio di colonie aerobiche (ACC) $< 2,5$ UFC/cm², l'assenza di MRSA, valori di ATP bioluminescenza < 250 RLU per altri autori (Sherlock *et al.*, 2009) sono indicativi di una superficie pulita. A riguardo, i valori di riferimento di RLU sono proporzionali alla sensibilità del campione all'ATP bioluminescenza e allo strumento di questa misura. Vale a dire che un valore limite più basso, come per es. 100 RLU, richiede un maggior numero di campionamenti. Secondo Mulvey *et al.* un livello di 100 RLU è correlabile a 2,5 UFC/cm² in base al kit di analisi da loro utilizzato e potrebbe essere uno standard da applicare per il post sanificazione degli ambienti, sebbene in alcuni punti di campionamento con valori di < 100 RLU siano stati identificati degli stafilococchi (Mulvey *et al.*, 2011).

Anche una conta microbica totale < 5 UFC/cm² è stata indicata come standard microbiologico per le superfici sottoposte a frequenti contatti negli ospedali (Dancer, 2004); peraltro tale valore è lo stesso indicato dalla *Swedish Food Standard Agency* per le attrezzature per la produzione del cibo (Swedish code of statute SLVSFS, 1998). Per valutare l'efficacia della pulizia negli ambienti ospedalieri (Malik *et al.*, 2003) è stato proposto anche un valore di CBT $< 2,5$ UFC/cm².

Finora sono stati considerati valori di riferimento di contaminazione elaborati per gli ambienti sanitari in genere, ma i locali ospedalieri sono caratterizzati da diversi livelli di rischio di infezione a seconda del tipo di attività che vi si svolge, della presenza e della tipologia dei pazienti (dall'ingresso alle sale operatorie). Le linee guida francesi (Raccomandazioni Areclin) distinguono l'ambito ospedaliero in "zone" e i limiti di accettabilità della contaminazione post sanificazione variano a seconda delle zone stesse. Le zone, identificate con numeri dallo 0 al 5 a seconda del rischio crescente, sono le seguenti:

- Zona 0 : assenza di rischio (le parti esterne);
- Zona 1: assenza di rischio (reparto amministrativo e logistico);
- Zona 2: a basso rischio (reparto di pazienti non defedati);
- Zona 3: rischio significativo (reparto di pazienti defedati);
- Zona 4: rischio elevato (reparto di pazienti molto defedati);
- Zona 5: rischio molto elevato (reparto di pazienti altamente defedati).

La frequenza dei controlli microbiologici per le zone 2 e 3 è considerata facoltativa, a richiesta, mentre per la zona 4 deve essere stabilita una periodicità e per la zona 5 il controllo è sistematico (circa due volte l'anno).

Non vengono dati valori di riferimento per organismi indicatori, ma si riporta che la presenza di alcuni organismi, come *Staphylococcus spp.*, *Aspergillus spp.*, *Aciteno-*

bacter spp., *Enterobacteriace*, *Pseudomonas* spp., altri batteri Gram-negativi e lieviti, indica la necessità di effettuare ulteriori indagini (Assistance Publique Hospital de Paris - 2004).

Altri lavori, sempre afferenti al settore ospedaliero, riportano valori di riferimento specifici per tipologia di ambiente.

Huang *et al.* (2013) hanno portato avanti uno studio sull'eventuale relazione diretta tra la contaminazione microbica dell'aria e quella delle superfici, concludendo per una debole positiva correlazione solo per i campioni di *Pseudomonas aeruginosa*. I valori del campionamento delle superfici, effettuato tramite tamponi su 7 superfici delle stanze e delle attrezzature, e del bioaerosol sono espressi in UFC/piastra per essere confrontabili tra loro. Il campionamento dell'aria è espresso in UFC/m³ per confrontarlo con i valori limite raccomandati dall'EPA di Taiwan (500 UFC/m³ per i batteri e 1000 UFC/m³ per i funghi).

Nel valutare le superfici degli ambulatori chirurgici Inail Catamo *et al.*, sulla base di riferimenti bibliografici precedenti, hanno considerato tre classi di contaminazione: accettabile, dubbia e alterata. Per la carica batterica totale un valore > 5 UFC/cm² è stato ritenuto come una situazione alterata, per la carica micetica 3 UFC/cm². I campionamenti sono stati effettuati durante 3 orari di lavoro: prima dell'inizio dell'attività lavorativa, durante e alla fine del turno, dopo la pulizia degli ambienti. I valori indicati per i batteri, corrispondono a quelli indicati come standard da Dancer per gli ambienti ospedalieri, mentre variano per *Staphylococcus* spp.

Luksamijarulkul e Pipitsangjan (2015) hanno analizzato la qualità microbica dell'aria e delle superfici in occasione di 30 corse in autoambulanza. Oltre a riscontrare campionamenti con risultati superiori allo standard che avevano adottato (< 5 UFC/cm²) hanno trovato una correlazione significativa tra la contaminazione batterica e fungina presente nell'aria e quella sulle superfici analizzate.

Per quanto riguarda gli studi dentistici è stato condotto uno studio multicentrico in Italia che ha coinvolto 102 strutture dislocate in 8 città. L'analisi della contaminazione batterica è stata effettuata su aria, acqua e superfici, prima e durante l'attività lavorativa. Per le superfici è stato ritenuto come accettabile un valore massimo di 1 UFC/cm² (Castiglia *et al.*, 2008). Ampliando e analizzando i dati precedenti, i partecipanti allo studio multicentrico hanno stabilito uno standard di riferimento elaborando le mediane dei campionamenti effettuati, all'inizio e alla fine del turno di lavoro, negli studi dentistici sulle superfici di lavoro ($\leq 0,64$ UFC/cm²) e sugli interruttori ($\leq 0,64$ UFC/cm²) (Pasquarella *et al.*, 2012). Gli autori hanno anche definito, per entrambe le superfici, un valore di allerta, calcolandolo come 75° percentile dei valori di mediana, rispettivamente 1,48 UFC/cm² e 1,31 UFC/cm².

I metodi (test ATP e RODAC) sono ritenuti entrambi efficaci per misurare la pulizia e la sanificazione di stalle, stabulari e attrezzature di ricovero degli animali, considerando però che l'ATP bioluminescenza è economicamente più vantaggiosa. Per valutare la contaminazione i limiti proposti sono quelli dell'APHA per pavimenti di stanze ospedaliere, pari a 50 UFC/piastra (Ednie *et al.*, 1998).

Per la progettazione e la costruzione di *clean room* e di ambienti controllati, nel settore farmaceutico si fa riferimento al Federal Standard 209E, sostituito poi dalla ISO 14644, che individua delle classi di ambienti controllati. Anche se non è stata dimostrata una relazione diretta tra le classi di ambienti controllati e i livelli microbiologici presenti, l'industria farmaceutica ha utilizzato come standard quelli indicati nelle GMP (*Good Manufacturing Practice*) dagli anni '60 (Ashour *et al.*, 2011).

A livello europeo, per le *clean room* è disponibile una guida alle GMP per la produzione dei medicinali sterili (2008) che, alla luce dello standard UNI EN ISO 14644-1, raccomanda i seguenti limiti di contaminazione microbiologica riportati nella Tabella 16, suddivisi per zona (da A a D con A: operazioni ad alto rischio, B: preparazioni asettiche a riempimento, C e D: operazioni meno critiche). Altri autori riportano valori più alti per la zona A (<3 UFC).

La *Guide du bionettoyage*, *Commission Centrale des Marchés* (1990) per il settore farmaceutico identifica 4 zone (da 1 a 4), con i rispettivi limiti di contaminazione.

Tabella 17 - Settore alimentare

Ambiente	Metodo	Valori di riferimento	Agente microbiologico indicatore specifico	Riferimenti bibliografici	Fonti dei limiti
Preparazione degli alimenti	Piastre a contatto 25,8 cm ² 20-25°C per 48h Tamponi	<150 UFC/piastra	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Escherichia coli</i> <i>S. aureus</i>	Silverman <i>et al.</i> , 1981	
	Piastre a contatto	Sanificazione accettabile: CBT ≤ 10 UFC/cm ²	Coliformi totali ≤ 1 UFC/cm ² Assenza <i>Salmonella</i> Assenza <i>Listeria monocytogenes</i>		Legge 30/04/62 n. 283 Regolamento CE n. 2073/2005
Preparazione degli alimenti (mense)		Sanificazione accettabile: CBT < 10 UFC/cm ²	Coliformi totali < 1 UFC/cm ²	Osimani <i>et al.</i> , 2014	
Preparazione degli alimenti (superfici e attrezzature)	Piastre a contatto da 24 cm ² : CBT 30°C per 72h CMT 25°C per 120h Coliformi 37°C per 24h	UFC/piastra: 0 - 2 Molto buono 3 - 9 Buono 10 - 29 Soddisfacente 30 - 90 Discutibile > 90 Inaccettabile	Coliformi, <i>S. aureus</i>	Biolife italiana - Dossier Igiene 2009	ISO 18593:2004 Doc. ISO/TC 34/SC 9 N 374, march, 1999
	Tamponi	UFC/100 cm ² : 0 - 8 Molto buono 12 - 36 Buono 37 - 116 Soddisfacente			

La contaminazione microbiologica delle superfici negli ambienti lavorativi

Segue: Tabella 17 - Settore alimentare

Ambiente	Metodo	Valori di riferimento	Agente microbiologico indicatore specifico	Riferimenti bibliografici	Fonti dei limiti
		117 – 360 Discutibile: > 360 Insoddisfacente			
Macellerie e supermercati	Piastre a contatto	Soddisfacente ≤ 4 UFC/cm ² Accettabile 4-12 UFC/cm ² Insoddisfacente > 12 UFC/cm ²	Coliformi ed <i>E.coli</i> soddisfacente < 1 UFC/cm ² insoddisfacente ≥ 1 UFC/cm ²	Souliotis <i>et al.</i> , 2015	
Catering	Piastre a contatto 30°C per 72h	≤ 4 UFC/cm ² Utensili a contatto con cibo: ≤ 1 UFC/cm ²		Garayoa <i>et al.</i> , 2014	
Ristoranti ed aziende alimentari	Tamponi 30°C per 24 - 48h	80 UFC/cm ²		Azizkhan, 2014	Final Report 06NS3. 3rd trimester National Microbiological Survey 2006 (06NS3). Examination of the microbiological status of food preparation. September 18, 2013 Murphy <i>et al.</i> , 1998
	ATP bioluminescenza	50 RLU			

Segue: Tabella 17 - Settore alimentare

Ambiente	Metodo	Valori di riferimento	Agente microbiologico indicatore specifico	Riferimenti bibliografici	Fonti dei limiti
Sale microbiologicamente controllate (piatti cucinati)	Piastre a contatto CBT 37°C per 24h poi T amb. per 48h	Valori distinti per zone*: Zona 1 < 5 UFC/cm ² Zona 2 < 2 UFC/cm ² Zona 3 < 0,2 UFC/cm ² Zona 4 < 0,2 UFC/cm ²		<i>Guide du bionetto- yage, Commission Centrale des Mar- chés 1990</i>	

* Zona 1: Apertura delle merci in arrivo, stoccaggio refrigerato delle derrate alimentari, locali rifiuti, stoccaggio/lavorazione materie prime.
 Zona 2: Prelievo delle derrate dal frigo, rimozione seconda protezione, decontaminazione in ingresso, disimballaggio confezioni vuote, uscita/etichettatura prodotti finiti imballati.
 Zona 3: Lavaggio, stoccaggio/ lavorazione derrate prima del disimballaggio, stoccaggio degli imballaggi prima dell'uso.
 Zona 4: Disimballaggio, assemblaggio, affettatura, ripartizione, stoccaggio imballaggi aperti, imballaggio.

Tabella 18 - Settore abitazioni civili

Ambiente	Metodo	Valori di riferimento	Agente microbiologico indicatore specifico	Riferimenti bibliografici	Fonti dei limiti
Abitazioni	Piastre a contatto CMT 28°C	Basso: < 10 UFC/25 cm ² Medio: 11 < UFC/25 cm ² < 50 Alto: > 50 UFC/25 cm ²		Bech-Andersen e Elborne, 2003	

Le superfici nel settore alimentare possono costituire un substrato di crescita per la flora microbica, essendo una riserva di potenziali elementi nutritivi derivati dai residui alimentari. Tale flora microbica può essere disseminata per mezzo dell'aria e dell'acqua, per veicolazione da parte del personale di produzione e/o per contatto diretto con il prodotto. Per queste ragioni deve essere verificata l'efficacia della pulizia e della disinfezione, attraverso tecniche microbiologiche validate, che impiegano piastre a contatto o tamponi (Dossier Igiene della Biolife Italiana, 2009).

Silverman *et al.* (1981) ritengono che, rispetto alle 50 UFC/piastra suggerite come limite per gli ospedali (APHA, 1970), per le superfici adibite alla preparazione del cibo sia accettabile una conta < 150 UFC/piastra. Altri autori, per le superfici destinate alla preparazione dei cibi, ritengono accettabili livelli di sanificazione che mantengano la carica batterica mesofila al di sotto di 10 UFC/cm², con una presenza di coliformi totali ≤ 1 UFC/cm² e l'assenza di *Salmonella* (legge 30/04/62 n. 283) e di *Listeria monocytogenes* (regolamento CE n. 2073/2005). Gli stessi valori sono indicati anche da Osimani *et al.* (2014) per la carica batterica totale e i coliformi nei controlli HACCP all'interno di mense.

Souliotis *et al.* (2015) hanno proposto uno standard di riferimento per le superfici delle macellerie dei supermercati, ritenendo "soddisfacente" un livello di carica ≤ 4 UFC/cm², "accettabile" un valore compreso nel range 4 - 12 UFC/cm² e "insoddisfacente" un valore superiore a 12 UFC/cm². Come organismi indicatori hanno considerato sia i coliformi totali che *E. coli*, ritenendo "insoddisfacente" qualsiasi valore di concentrazione uguale o al di sopra di 1 UFC/cm². Lo stesso valore di 4 UFC/cm² viene indicato per le superfici di lavorazione nei *catering*, abbassandolo ad un massimo di 1 UFC/cm² nel caso di utensili a diretto contatto con gli alimenti (Garayoa *et al.*, 2014).

Nella *Guide du bionettoyage*, Commission Centrale des Marchés (1990) gli ambienti in cui sono trattati gli alimenti cucinati sono classificati in "zone", analogamente a quanto operato per il settore ospedaliero e farmaceutico, a ognuna delle quali sono attribuiti limiti di concentrazione diversi, compresi tra 0,2 e 5 UFC/cm².

Azizkhan (2014) ha misurato il livello di contaminazione ambientale nelle industrie alimentari, utilizzando tamponi e ATP bioluminescenza, verificando l'esistenza o meno di una correlazione positiva tra i due metodi. I campionamenti hanno riguardato le superfici a contatto con gli alimenti (miscelatore crema, taglieri, spremiagrumi, e coltelli, e il piano di lavoro in marmo della zona pasticceria). Prima dell'intervento di pulizia dei locali i campioni mostravano livelli elevati di contaminazione, che si riducevano drasticamente dopo la pulizia. Prima della pulizia il coefficiente di correlazione (R) tra le due metodiche impiegate risultava molto basso, mentre dopo la fase di pulizia e sanificazione il valore di R era alto. Secondo l'autore ciò era imputabile probabilmente alle differenze tra i due metodi di rilevamento: infatti, mentre l'uso dei tamponi e la successiva messa in coltura dei campioni sono in grado di rilevare soltanto la presenza di microrganismi vitali, il metodo ATP bioluminescenza può rilevare anche la presenza di residui di cibo sulla superficie (questo spiegherebbe l'ele-

vato valore di RLU misurato nei locali esaminati). Quindi l'ATP bioluminescenza può essere un valido strumento operativo per monitorare il grado di pulizia delle superfici delle industrie alimentari.

Per quanto riguarda le abitazioni civili, in letteratura (Bech-Andersen e Elborne, 2003) sono presenti valori di riferimento per la carica micetica.

Appare chiaro, analizzando le tabelle, che non esiste omogeneità nell'interpretazione dei risultati analitici sia tra i diversi settori lavorativi che all'interno dello stesso settore. Tuttavia si osservano alcune indicazioni ricorrenti.

Innanzitutto diverse norme tecniche propongono l'individuazione di differenti "zone" all'interno di una stessa tipologia di ambiente di lavoro, caratterizzate da livelli diversi di rischio biologico e/o di possibilità di contaminazione, anche in funzione della diversa suscettibilità delle persone ivi presenti (vedi ambiti ospedalieri). Tale approccio potrebbe essere utile per altri ambienti di lavoro e l'individuazione delle zone effettuata:

- a) per ambienti normati, in base alla norma (ambienti sanitari, farmaceutici, *clean room*);
- b) per ambienti non normati, in base agli esiti della valutazione del rischio biologico, avvalendosi eventualmente delle indicazioni contenute nelle norme tecniche di altri settori lavorativi.

Per le diverse zone sono individuati criteri di interpretazione dei risultati. Per gli ambienti non normati può essere utile una disamina generale delle norme precedentemente riportate. I criteri di interpretazione prevedono solitamente due o tre livelli di giudizio: ottimale (*target*), accettabile (di allerta), non accettabile (di azione).

Contaminazione batterica

Per ambienti critici (es. sale operatorie di ospedali e *clean room*) viene proposto dai diversi autori un valore di carica batterica totale ottimale pari a 0,2 UFC/cm²; per zone a rischio molto alto il valore ottimale è 0,04 UFC/cm².

Per ambienti che potremmo definire a media criticità (ovvero assimilabili ai reparti di degenza delle strutture ospedaliere) vengono proposti valori ottimali variabili tra 0,6 e 2,5 anche in funzione delle diverse tipologie ambientali, con un valore modale pari a 2 UFC/cm².

Per ambienti a bassa criticità, come ad esempio uffici, zone di transito, ecc. il valore ottimale indicato è 5 UFC/cm².

Nel settore alimentare si nota una variabilità ancora maggiore, dovuta probabilmente alla necessità degli operatori del settore di garantire e garantirsi uno standard di qualità quanto più possibile specifico ed oggettivo. I valori indicati come ottimali per superfici sulle quali vengono preparati gli alimenti variano da 0,08 a 10 UFC/cm²; in un caso, riferito a superfici di ristoranti, si arriva però fino a 80 UFC/cm². Il valore modale è pari a 10 UFC/cm².

Contaminazione fungina

In ambito sanitario molte infezioni, specialmente opportunistiche, sono sostenute da miceti: tuttavia, gli studi e le proposte di valori di riferimento sono molto scarse in letteratura, rispetto a quelli sulla contaminazione batterica. Quando presenti, le indicazioni in merito alla contaminazione fungina evidenziano valori ottimali in generale più bassi di quelli della contaminazione batterica.

In conclusione, in assenza di eventi patologici specifici, la comunità scientifica è orientata verso un approccio analitico che consenta di conoscere il livello globale di contaminazione microbica delle superfici. Tenuto conto dell'oggettiva difficoltà di interpretazione dei singoli risultati e dando per scontato l'utilizzo della medesima metodologia di indagine, l'analisi dell'andamento nel tempo dei valori assume rilevanza per il controllo dei livelli di contaminazione ambientale.

7. La sanificazione e disinfezione delle superfici

La legge n. 82 del 25 gennaio 1994, il d.m. n. 274 del 7 luglio 1997 e infine il d.l. n.7 del 31 gennaio 2007 regolamentano, in Italia, la disciplina delle attività di pulizia, di disinfezione, di derattizzazione e di sanificazione e i requisiti delle imprese che effettuano tali servizi, fornendone le definizioni:

PULIZIA: complesso di procedimenti e operazioni atti a rimuovere polveri, materiale non desiderato o sporizia da superfici, oggetti, ambienti confinati e aree di pertinenza;
DISINFEZIONE: complesso dei procedimenti e operazioni atti a rendere sani determinati ambienti confinati e aree di pertinenza mediante la distruzione o inattivazione di microrganismi patogeni;

DISINFESTAZIONE: complesso di procedimenti e operazioni atti a distruggere piccoli animali, in particolare artropodi, sia perché parassiti, vettori o riserve di agenti infettivi sia perché molesti e specie vegetali non desiderate. La disinfestazione può essere integrale se rivolta a tutte le specie infestanti ovvero mirata se rivolta a singola specie;
DERATTIZZAZIONE: complesso di procedimenti e operazioni di disinfestazione atti a determinare o la distruzione completa oppure la riduzione del numero della popolazione dei ratti o dei topi al di sotto di una certa soglia;

SANIFICAZIONE: complesso di procedimenti e operazioni atti a rendere sani determinati ambienti mediante l'attività di pulizia e/o di disinfezione e/o di disinfestazione ovvero mediante il controllo e il miglioramento delle condizioni del microclima per quanto riguarda la temperatura, l'umidità e la ventilazione ovvero per quanto riguarda l'illuminazione e il rumore.

L'igiene riveste un ruolo molto importante nel garantire il mantenimento di adeguati livelli di sicurezza nelle strutture sanitarie, nell'industria alimentare e in qualunque altro ambiente di lavoro.

Nell'industria alimentare il processo di sanificazione consente di evitare la contaminazione tra alimenti - operatore - ambiente, aumentando la sicurezza igienica dei prodotti e la loro vita commerciale. Le norme di riferimento attualmente vigenti sono il regolamento CE n. 852/2004 sull'igiene dei prodotti alimentari, che estende l'obbligo dell'HACCP a tutto il comparto alimentare, il regolamento n. 853/2004 relativo all'igiene dei prodotti di origine animale ed il regolamento CE n. 2073/2005 inerente i criteri microbiologici degli alimenti.

Il monitoraggio della contaminazione microbica aerodispersa e delle superfici è di fondamentale importanza in tutte le situazioni in cui una non ottimale condizione igienica può comportare la contaminazione dei prodotti alimentari e la possibile dif-

fusione di infezioni o di malattie. Tale controllo è importante e necessario per verificare l'efficacia delle procedure di pulizia che solitamente sono applicate in ambienti quali mense, mense aziendali e industrie alimentari.

Nell'ambiente sanitario e socio-sanitario il rischio di trasmissione di microrganismi patogeni a oggetti, ambiente, pazienti, operatori sanitari e visitatori è alto. Per controllare il rischio un ruolo determinante svolgono l'igiene ambientale e della persona, la disinfezione dei presidi medici riutilizzabili e delle attrezzature sanitarie oltre, ovviamente, la sterilizzazione degli strumenti.

Nel tempo sono stati condotti studi sulle dinamiche della contaminazione e sull'efficacia dei prodotti disinfettanti e della sterilizzazione e sono state messe a punto procedure adeguate di pulizia, antisepsi e disinfezione anche tenendo conto della tipologia del materiale da trattare e del suo utilizzo. Non esiste un disinfettante valido per ogni occasione. Requisiti "ideali" che queste sostanze dovrebbero possedere (CDC - Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008) sono:

- ampio spettro di azione;
- rapidità nell'azione e capacità di mantenere l'attività per un periodo di tempo il più lungo possibile;
- capacità di agire anche in presenza di sostanze organiche (sangue, urine, feci, pus, tessuto necrotico);
- essere privi di tossicità acuta e cronica;
- facile impiego;
- non alterare i tessuti viventi e i materiali da trattare;
- costo contenuto;
- elevato potere di penetrazione;
- inodori o avere un odore piacevole;
- essere solubili nei liquidi di uso comune (acqua potabile) senza precipitazione della soluzione;
- buone proprietà pulenti;
- non dovrebbe arrecare danni all'ambiente in seguito allo smaltimento.

Attualmente le soluzioni in commercio non possiedono contemporaneamente tutti i requisiti ideali.

I disinfettanti

Come noto, l'efficacia dei disinfettanti nel prevenire le infezioni è condizionata da molti fattori e, in particolare, da:

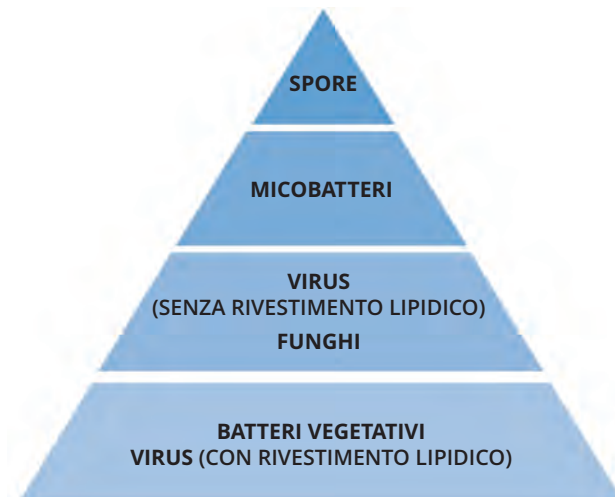
- *caratteristiche di attività del prodotto: i disinfettanti presentano spettri di azione anche molto diversi tra loro;*
- *modalità d'uso;*
- *concentrazione di impiego: esiste una concentrazione ottimale, concentrazioni inferiori causano l'inefficacia o la riduzione di attività del disinfettante o antisettico, con-*

- centrazioni superiori possono essere all'origine di effetti indesiderati anche gravi;
- *tempo di contatto*: deve essere rigorosamente rispettato per garantire l'efficacia del disinfettante, può variare in funzione dell'indicazione d'uso.

Condizioni ambientali:

- *temperatura*: in alcuni casi un aumento della temperatura può incrementare l'efficacia del disinfettante, in altri può causare la sua degradazione;
- *pH*;
- *presenza di materiale organico* (ad esempio sangue, pus, plasma, feci, urine): può ridurre o annullare l'attività del disinfettante o antisettico sia formando sulla superficie dei microrganismi un rivestimento, che li protegge dall'azione del principio attivo, sia reagendo con il disinfettante stesso, neutralizzandone così l'efficacia;
- *carica microbica*: la presenza di un elevato numero di microrganismi riduce la probabilità di successo del processo. Di qui la necessità di garantire una accurata detersione preliminare che, eliminando il materiale organico e abbattendo la carica microbica, crea le condizioni necessarie a garantire il successo della disinfezione. Bisogna anche ricordare che l'attività dei disinfettanti è massima sui microrganismi in sospensione mentre batteri in biofilm o essiccati sono più resistenti.
- *tipologia dei microrganismi presenti*: le varie specie di microrganismi hanno una diversa sensibilità all'azione dei disinfettanti (Tabella 19).

Tabella 19 - Ordine crescente di resistenza dei microrganismi ai disinfettanti chimici



Non esiste, quindi, un disinfettante valido per tutti gli usi. La scelta deve essere fatta valutando di volta in volta il materiale da trattare e la sua destinazione d'uso, il livello

di disinfezione da raggiungere, la popolazione microbica che si ipotizza contaminare l'oggetto, il grado di rischio per paziente e operatore, il costo dell'intervento.

Principi attivi più utilizzati per la disinfezione

a) Alcoli

Chimicamente gli alcoli sono solventi dei grassi; per questo posseggono un buon potere detergente. L'attività battericida, che si esplica attraverso l'effetto denaturante sulle proteine, si realizza solo in presenza di una adeguata percentuale di acqua, quindi in soluzione acquosa. L'attività biocida ottimale avviene a concentrazioni comprese tra il 60 e il 90% in acqua; a concentrazioni superiori al 90% l'attività biocida diminuisce, mentre prevale quella disidratante che causa fenomeni "di protezione" del microrganismo all'azione del disinfettante.

SPETTRO D'AZIONE: gli alcoli hanno azione battericida contro le forme vegetative dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi, sono parzialmente virucidi, ma non distruggono le spore batteriche. L'attività è massima sui microrganismi in sospensione, ridotta sui microrganismi essiccati, ad esempio, su superfici.

Gli alcoli non sono da considerarsi adatti a disinfezioni di alto livello; essi potenziano l'azione di alcuni principi attivi disinfettanti e antisettici, come clorexidina gluconato, PVP-iodio, ecc.

Le soluzioni in alcool al 70% sono indicate solo per la disinfezione di medio livello di oggetti semicritici e non critici, tenendo conto che lo spettro d'azione non è completo e che è necessario garantire l'assenza di materiale organico. Il tempo di azione richiesto è di almeno 10 minuti.

L'alcool denaturato trova indicazione solo come solvente e detergente, quindi il trattamento rapido di superfici lisce e dure sfrutta queste sue proprietà, in quanto la rapida evaporazione non consente un tempo di contatto sufficiente a garantire un effetto disinfettante sicuro.

b) Cloroderivati

Tutti i derivati del cloro agiscono attraverso la liberazione di acido ipocloroso, che è il vero agente antimicrobico e si dissocia liberando lentamente ossigeno nascente il quale a sua volta svolge azione battericida. Il potere disinfettante di tutti i composti che liberano cloro viene espresso come "cloro disponibile". La concentrazione delle soluzioni di composti del cloro si esprime convenzionalmente in % di cloro disponibile o cloro attivo ed in disinfezione come parti per milione (ppm); il rapporto che intercorre tra le due espressioni è: $1\% = 10000 \text{ ppm}$.

Gli **ipocloriti**, che tra i disinfettanti a base di cloro sono i più usati, sono disponibili sia in forma liquida (es. ipoclorito di sodio) che in forma solida (es. ipoclorito di calcio, dicloroisocianurato di sodio).

Il clorossidante elettrolitico è una preparazione di sodio ipoclorito caratterizzato da un elevato grado di purezza. Le soluzioni di clorossidante elettrolitico sono più stabili

e hanno un pH meno alcalino rispetto all'ipoclorito di sodio, unendo così un minor potere irritante a una maggiore concentrazione in acido ipocloroso (composto a cui si deve l'azione disinfettante).

SPETTRO D'AZIONE: in condizioni ottimali la loro attività è a spettro piuttosto ampio: batteri Gram-positivi, Gram-negativi, funghi e virus idrofili e lipofili, micobatteri e perfino, in condizioni particolari, sulle spore.

La presenza di materiale organico riduce notevolmente l'attività dei cloroderivati, che devono essere usati su oggetti e superfici puliti.

I derivati del cloro non devono essere impiegati su oggetti metallici perché sono corrosivi. Non si devono utilizzare in presenza di acidi forti perché si ha la liberazione di vapori tossici. Se utilizzati a una concentrazione superiore a quelle usuali, hanno azione irritante per cute e mucose.

A diverse concentrazioni e formulazioni vengono usati per:

- disinfezione ambientale e di attrezzature sanitarie. L'ipoclorito di sodio allo 0,5% in cloro attivo (sodio dicloroisocianurato in granuli) è il disinfettante di scelta per lo spandimento accidentale di materiale biologico;
- antisepsi di ferite e mucose.

c) Derivati fenolici

Sono derivati dal fenolo, capostipite di questa famiglia, rispetto al quale presentano migliori caratteristiche di sicurezza (diminuzione della tossicità) e di attività antimicrobica anche in presenza di materiale organico. I derivati fenolici maggiormente usati nell'ambito della disinfezione e dell'antisepsi possono essere così suddivisi dal punto di vista chimico:

- alchil e aril fenoli (tra cui l'ortofenil fenolo e para-cloro-meta-cresolo);
 - fenoli alogenati (tra cui il para cloro meta cresolo e l'ortobenzil-para-clorofenolo).
- A questo sotto gruppo appartengono anche esaclorofene e triclosan utilizzati in antisepsi.

SPETTRO D'AZIONE: ogni derivato ha uno spettro di attività biocida mirato; per questo, nella pratica, si utilizzano associazioni di fenoli, così da aumentare l'efficacia.

I derivati fenolici sono attivi su batteri Gram-positivi, Gram-negativi, virus lipofili (HIV, HCV e HBV) e sul micobatterio. Le miscele polifenoliche attualmente disponibili in commercio non sono tuttavia sporicide.

I derivati fenolici sono utilizzati per la decontaminazione di strumenti chirurgici prima della pulizia e della sterilizzazione.

In associazione con idonei detergenti o emulsionanti, che aumentano l'efficacia biocida della miscela, sono utilizzati per la disinfezione ambientale (pavimenti, arredi, superfici). L'uso dei fenoli in ambienti pediatrici è stata messo in discussione a causa dell'insorgenza di iperbilirubinemia in bambini tenuti in nidi che utilizzano detergenti fenolici: i composti fenolici non dovrebbero essere usati per la pulizia di culle e delle incubatrici.

d) Clorexidina

La clorexidina è, in origine, un composto biguanidico cationico dotato di gruppi lipofili. Si presenta come una polvere bianca, a reazione basica, praticamente insolubile in acqua e in gran parte dei solventi organici. Viene salificata con l'acido gluconico per renderla solubile in acqua e alcool (clorexidina gluconato). La clorexidina gluconato a basse concentrazioni esercita attività batteriostatica mentre a concentrazioni più elevate è battericida. Il meccanismo d'azione è di tipo elettrostatico, cioè la carica cationica (+) della clorexidina gluconato attira le cariche negative delle cellule batteriche sulla cui membrana si fissa provocando, a elevate concentrazioni, danni irreversibili. La struttura molecolare della clorexidina possiede un'elevata affinità per le proteine dell'epidermide, che determina il suo rapido e persistente assorbimento a livello dello strato corneo della cute dove permane molte ore. Impieghi ripetuti consentono, così, di ottenere un effetto antibatterico cumulativo. Il pH ottimale per la sua attività varia da 5 a 7, che corrisponde al *range* del pH epidermico. La clorexidina è caratterizzata da bassa tossicità ed elevata e rapida azione battericida.

SPETTRO D'AZIONE: è un biocida a spettro limitato. Infatti ha attività elevata su batteri Gram-positivi ma minore su Gram-negativi (*Pseudomonas* e *Proteus* sono resistenti). Ha limitata attività su funghi. Nei confronti dei virus, l'attività è solo a livello dei lipofili (alcuni virus delle vie respiratorie, herpes, citomegalovirus) ed è comunque variabile. Non ha attività sporicida.

L'otossicità e la neurotossicità ne precludono l'impiego nella chirurgia dell'orecchio e del sistema nervoso centrale. L'associazione di clorexidina con un sale di ammonio quaternario (cetrimide) porta a un prodotto con buona azione battericida e ottime caratteristiche detergenti.

e) Iodofori

Gli iodofori sono dei complessi solubili di iodio con una molecola organica ad alto peso molecolare (che funziona da trasportatore, come, ad es. il polivinilpirrolidone - PVP) in grado di rilasciare gradualmente lo iodio.

La concentrazione di iodopovidone viene espressa in termini di iodio disponibile, che è la somma dello iodio libero e di quello di riserva. Nelle soluzioni al 10% di iodopovidone la concentrazione di iodio disponibile è pari all'1% (10000 ppm). L'attività biocida è determinata dallo iodio che si libera dallo iodoforo. I vantaggi di questi complessi rispetto allo iodio libero sono:

- aumento della solubilità dello iodio in acqua (miscibilità in acqua in tutte le proporzioni);
- liberazione graduale dello iodio con diminuzione degli effetti indesiderati derivanti dalle alte concentrazioni di questo elemento quali: irritazione e colorazione dei tessuti, corrosione di superfici metalliche;
- proprietà tensioattive con conseguente migliore penetrazione nei substrati organici.

SPETTRO D'AZIONE: lo iodio molecolare ha proprietà battericide, virucide, fungicide, micobattericide e sporicide, nelle opportune condizioni, ma gli iodofori, a causa del minor contenuto di iodio molecolare libero, sono caratterizzati da una minore attività. In particolare l'attività potrà essere di tipo batteriostatico o battericida in funzione delle caratteristiche della soluzione scelta.

Il campo di applicazione degli iodofori distingue i vari prodotti per:

- antisepsi preoperatoria delle mani
- antisepsi preoperatoria della cute integra del campo operatorio
- antisepsi delle venipunture, biopsie, artroscopie ecc.
- antisepsi della cute lesa (ferite, piaghe, ustioni).

Tutti questi disinfettanti devono essere conservati in contenitori scuri, ben chiusi, al riparo dalla luce e dal calore. Gli iodofori, per ripetute applicazioni, possono essere responsabili di dermatiti allergiche da contatto ed eruzioni orticarioidi. Sono incompatibili con acetone e acqua ossigenata. Sono stati riportati casi di acidosi metabolica, neutropenia ed ipotiroidismo per impiego di PVP-Iodio nell'antisepsi cutanea dei neonati.

f) Perossido d'idrogeno

La preparazione comunemente usata per l'antisepsi ha una concentrazione del 3% peso/volume ed è nota come acqua ossigenata.

Liquido incolore, quasi inodore. È un potente biocida sui materiali inanimati, ma ha un'attività molto blanda sui tessuti viventi. La blanda azione antiseptica è però accompagnata da un'efficace detersione meccanica con rimozione di piccoli detriti e dei tessuti necrotici delle ferite, grazie allo sviluppo di ossigeno nascente. Tale reazione è rapida, pertanto l'effetto è molto breve.

SPETTRO D'AZIONE: lo spettro d'azione è diverso in funzione delle condizioni d'uso (concentrazione, tempo, temperatura) e del campo d'impiego. Il perossido d'idrogeno stabilizzato è attivo con un gran numero di microrganismi, inclusi batteri, lieviti, virus e spore: risulta attivo in tempi brevi su anaerobi e batteri in forma vegetativa Gram-negativi; i batteri Gram-positivi risultano essere più resistenti; l'azione sui funghi e su alcuni virus è più lenta. Il perossido d'idrogeno stabilizzato al 7% si è dimostrato sterilizzante in 6 ore (Rutala e Weber - CDC 2008).

Viene utilizzato nel processo di sterilizzazione per dispositivi medici tramite autoclavi al gas plasma.

Alla concentrazione del 3% viene utilizzato nell'antisepsi di ferite, piaghe e abrasioni per avere una adeguata detersione prima di utilizzare un antiseptico più efficace, ove e quando necessario. Soluzioni più concentrate sono caustiche per cute e mucose.

g) Aldeidi

Questa famiglia comprende prodotti che sono dotati di un ampio spettro di attività, ma anche da una comune tossicità che li rende non adatti per l'impiego in antisepsi:

- Aldeide glutarica
- Ortoftalaldeide (OPA).

L'aldeide glutarica in soluzione acquosa è un liquido limpido incolore o leggermente giallino con un tipico odore pungente. È un potente biocida. La sua attività è soprattutto correlabile all'alchilazione dei gruppi sulfidrilici, carbossilici, aminici e idrossilici di costituenti di microrganismi, con alterazione irreversibile della sintesi proteica e degli acidi nucleici. La velocità di reazione è pH dipendente e raggiunge l'optimum nel *range* compreso tra pH 7,5-8,5; al di sopra di questo pH si ha diminuzione della stabilità. Non è inattivata da sostanze organiche, non è corrosiva sui metalli ed è compatibile con gomma, plastica e strumenti con lenti.

È il disinfettante di riferimento in linee guida a livello internazionale per la disinfezione di alto livello e sterilizzazione di materiali non sterilizzabili con il calore.

SPETTRO D'AZIONE: il suo spettro d'azione è ampio e comprende Gram-positivi, Gram-negativi, bacillo di Koch, funghi, virus (compreso HIV) e spore batteriche, ma i tempi d'azione variano a seconda delle condizioni. L'attività micobattericida risente delle condizioni operative (concentrazione, temperatura, associazioni di principi attivi) e del ceppo batterico (per *Mycobacterium tuberculosis* 60 minuti).

È necessario rispettare i tempi di contatto affinché i materiali si possano considerare sterili:

- 30 minuti per la disinfezione;
- 3 ore per la disinfezione ad alto livello;
- 10 ore per la sterilizzazione.

I tempi vanno adattati in rapporto alla strumentazione e all'uso.

Dopo il trattamento il materiale deve essere accuratamente risciacquato con acqua sterile.

Le soluzioni di aldeide glutarica vanno sempre maneggiate con cautela ricordando di conservarle in recipienti ben chiusi. L'aldeide glutarica va usata sotto cappa o in locali ben aerati, indossando idonei DPI I vapori sono irritanti per l'apparato respiratorio e il contatto diretto con la cute dà luogo a processi di sensibilizzazione fino a eczemi allergici.

In caso di contatto accidentale con gli occhi o la cute lavare abbondantemente con acqua.

L'aldeide glutarica va eliminata come rifiuto speciale, in apposite taniche tenute ben chiuse e ritirate dagli operatori della ditta deputata allo smaltimento.

L'ortoftalaldeide (OPA) costituisce una valida alternativa alla glutaraldeide al 2% quale disinfettante di alto livello. L'ortoftalaldeide è una molecola molto meno volatile della glutaraldeide e la sua tossicità, pur mantenendo gli stessi organi bersaglio della glutaraldeide è di minore rilevanza.

La concentrazione di utilizzo attualmente in commercio è dello 0,55% e a questa concentrazione risulta attiva più rapidamente rispetto alla glutaraldeide stessa nei con-

fronti di tutti i microrganismi (circa 10 minuti) con l'eccezione delle spore, relativamente alle quali ha necessità di concentrazioni più elevate e tempi superiori (1% per 10-12 ore o 0,55% per 24 ore).

È una soluzione stabile e attiva in un *range* di pH ampio, pertanto non necessita di attivazione. Per tempi di contatto prolungati può colorare permanentemente i substrati con cui viene a contatto.

Come per tutte le aldeidi le indicazioni di impiego sono limitate al settore della disinfezione, in particolare quella di alto livello, soprattutto per strumenti dotati di fibre ottiche.

È necessario che il personale adotti tutte le misure di sicurezza (DPI) nel maneggiarlo. Ulteriori studi potranno chiarire meglio il profilo di questo nuovo disinfettante.

h) Acido peracetico

L'acido peracetico è prodotto dalla reazione dell'acido acetico con l'acqua ossigenata. È caratterizzato da un'azione rapida contro tutti i microrganismi. I suoi prodotti di degradazione non sono pericolosi, per cui è buono anche l'impatto ambientale. Rimane efficace anche in presenza di materiale organico (richiede concentrazioni e tempi di contatto superiori) ed è sporicida anche a basse temperature.

L'attività dell'acido peracetico sembra sia legata alla sua capacità ossidante sia a livello della membrana cellulare dei microrganismi che all'interno della cellula microbica.

SPETTRO D'AZIONE: l'acido peracetico è caratterizzato da una rapida azione, anche a basse concentrazioni e basse temperature, su tutti i microrganismi, comprese le spore. Agisce su Gram-positivi, Gram-negativi, funghi e lieviti in 5 minuti a 100 ppm, in presenza di materiale organico sono necessari 200-500 ppm. È risultato efficace allo 0,26% contro tutti i ceppi di micobatteri - *M. tuberculosis*, *M. avium intracellulare*, *M. chelonae*, e *M. fortuitum* - entro 20-30 minuti in presenza o assenza di un carico organico - fattore di riduzione $\log_{10} > 5$. Tutti gli autori concordano nel ritenerlo tra i pochi sterilizzanti chimici e disinfettanti in grado di ottenere, in ambito sanitario, una disinfezione di alto livello.

È considerato instabile, in particolare quando diluito: per esempio, una soluzione all'1% perde la metà della sua forza attraverso idrolisi in 6 giorni, mentre l'acido peracetico 40% perde 1% - 2% dei suoi principi attivi in circa 1 mese (*Linee Guida CDC*, 2008).

Le soluzioni concentrate e i vapori di acido peracetico a contatto con cute e mucose causano fenomeni irritativi e a volte caustici, per questo bisogna seguire adeguate procedure per le fasi della sterilizzazione degli strumenti. Possono inoltre danneggiare e corrodere alcuni metalli e materiale plastici.

L'acido peracetico viene utilizzato nei sistemi chiusi automatizzati a variabili controllate come sistema sterilizzante *just in time*, per dispositivi medici semicritici totalmente immergibili, quando non sia attuabile o conveniente un altro tipo di sterilizzazione.

i) **Sali d'ammonio quaternari:** QAC - Benzalconio cloruro, Dimetildidecylammonio cloruro (benzoxonio, cetrimide).

Le caratteristiche chimico-strutturali dei composti dell'ammonio quaternario ne definiscono l'impiego e dipendono dal tipo e dal numero di radicali alchilici e arilici presenti nella molecola. Come disinfettanti possiedono diverse proprietà antimicrobiche, quali effetto denaturante, complessante e precipitante sulle proteine. Gli effetti sulla permeabilità cellulare e sulla funzionalità e integrità della membrana dipendono dalla loro concentrazione. A basse concentrazioni l'attività è batteriostatica con alterazioni della funzionalità di membrana e squilibrio dei gradienti elettrochimici. Ad alte concentrazioni promuovono un'azione battericida dovuta alla lisi della cellula microbica.

SPETTRO D'AZIONE: attivi su Gram-positivi e alcuni Gram-negativi, scarsamente attivi su alcuni miceti e su diversi Gram-negativi. Mancanza di attività sporigena, micobattericida e virucida. Inattivi sullo *Pseudomonas aeruginosa*. Alcuni microrganismi psicrofili possono manifestare resistenza.

Vengono inattivati dalle acque dure, dai residui organici, dalla cellulosa e dalla gomma. Sono incompatibili con i tensioattivi anionici; quando vengono miscelati con questi ultimi essi diventano inefficaci. Non sono facilmente degradabili. Essendo stabili nel tempo, quando vengono applicati su una superficie senza risciacquarli vi rimangono a lungo, in questo caso potrebbero dare origine a fenomeni di resistenza batterica. Per questo motivo è bene risciacquare a fondo la superficie trattata.

Negli allegati si riportano una tabella riepilogativa dei disinfettanti utilizzabili per la sanificazione delle superfici (Allegati b e c) e una tabella contenente la classificazione CLP di alcune sostanze ad azione disinfettante (Allegato d).

Disinfezione in campo alimentare

La scelta dei disinfettanti nel settore alimentare è condizionata sia dallo spettro di attività che dalla necessità di non lasciare residui tossici che potrebbero poi contaminare gli alimenti in lavorazione (Tabella 20).

Tra i disinfettanti più utilizzati nel settore alimentare troviamo:

- **soluzioni a base di cloro:** gli ipocloriti sono buoni prodotti e presentano aspetti positivi rispetto alle normali esigenze nei settori alimentari. Solitamente, comunque, si impiegano a diluizioni tali da contenere circa lo 0,2-0,5% di cloro attivo (ad esempio: candeggina commerciale 1 parte ogni 9 di acqua).
- **disinfettanti iodofori:** sono quelli che contengono iodio. Rispetto agli ipocloriti sono meno efficaci nella distruzione delle spore e vengono inattivati con maggior facilità da materiale organico. Vanno utilizzati ad esempio per locali di confezionamento sottovuoto, o comunque per ambienti, pavimenti e aria ambiente (atomizzazione). Alcuni prodotti a base di derivati dello iodio possono essere usati per la disinfezione delle mani del personale alimentarista (esempio: povidone ecc.).

- **composti di ammonio quaternario:** il loro potere battericida è inferiore agli ipocloriti o ai disinfettanti iodofori.
- **alcooli** (esempio: alcool denaturato): da soli sono spesso impiegati su superfici e attrezzature (ad esempio di taglienti e lame, per sfruttarne il potere sgrassante, ma la loro volatilità li rende poco penetranti e il loro potere disinfettante non è molto forte. Hanno però il vantaggio di non lasciare residui.
- **acidi e basi forti** (esempio: soda caustica, ammoniaca, acido muriatico) sono usati soprattutto per la loro capacità sgrassante e disincrostante. Occorre, prima di usarli, verificare la resistenza delle superfici da trattare alla loro azione corrosiva. I loro residui vanno eliminati con molta cura, prima di riutilizzare l'area per lavorarvi alimenti.

Tabella 20 - Principali applicazioni dei disinfettanti

	Acqua destinata al consumo umano	Industrie alimentari	Disinfezione ospedaliera
Cloro	SI	SI	SI
Iodofori	NO	SI	SI
Fenoli	NO	NO	SI
Ossidanti	SI	NO	NO
Sali quaternari	NO	SI	NO
Aldeidi	NO	NO	SI

Disinfezione in ambiente sanitario

Classificazione degli strumenti in ambito sanitario ai fini della disinfezione

In ambito sanitario, i dispositivi medici riutilizzabili necessitano di un idoneo trattamento di disinfezione/sterilizzazione prima del loro successivo utilizzo, scelto sulla base della classificazione degli strumenti secondo uno schema elaborato da Spaulding verso la fine degli anni sessanta.

Secondo questo schema (Spaulding, 1968; Rutala, 1990) i dispositivi utilizzati a scopo diagnostico e terapeutico possono essere divisi in tre categorie, in base al potenziale rischio di infezione che deriva dal loro uso (Tabella 21):

- **Articoli critici:** dispositivi destinati al contatto con tessuti normalmente sterili o col sistema vascolare; sono correlati a un alto rischio di trasmettere infezione;
- **Articoli semi-critici:** dispositivi destinati al contatto con mucose e cute integre;
- **Articoli non critici:** strumenti, oggetti o superfici che non entrano in contatto con il paziente o che entrano in contatto solo con cute integra.

Le superfici ambientali si riferiscono ad una quarta categoria, aggiunta successivamente (Favero, 1991).

Il sistema di classificazione di Spaulding stabilisce diversi livelli di trattamento per le 3 classi di articoli.

Tabella 21 - Tipologia di articoli, livelli di disinfezione applicata e riduzione microbica richiesta (Spaulding - modificato da Rutala e Weber, 2013)

Classificazione degli articoli	Tipologia degli articoli	Livelli di disinfezione	Efficacia sui microrganismi
ARTICOLI CRITICI Per specifica natura, indicazione d'impiego e tipologia del paziente.	Cateteri cardiaci, materiale impiantabile, laparoscopi, articoli impiegati su pazienti ad alto rischio	STERILIZZAZIONE	Tutti i microrganismi comprese le spore
ARTICOLI SEMICRITICI Per indicazione d'impiego e tipologia del paziente.	Endoscopi, laringoscopi, ecc.	STERILIZZAZIONE/ DISINFEZIONE DI LIVELLO ALTO	Tutti i microrganismi ad eccezione delle spore batteriche
ALCUNI ARTICOLI SEMICRITICI E NON CRITICI		DISINFEZIONE DI LIVELLO INTERMEDIO	Tutte le forme batteriche vegetative, il micobatterio, la maggior parte dei virus e dei funghi, ma non le spore batteriche
ARTICOLI NON CRITICI	Stetoscopi, elettrodi o altre superfici	DISINFEZIONE DI LIVELLO BASSO	Tutte le forme batteriche vegetative, alcuni funghi e virus, ma non micobatteri o spore

Per le superfici ambientali, come pavimenti, pareti, ripiani di tavoli, ecc. è sufficiente un'accurata pulizia con acqua e detergente ed eventualmente una disinfezione a livello intermedio o basso. In tale contesto è, però, necessario tenere in considerazione la suddivisione degli ambienti in base al rischio infettivo.

In conclusione, diversi studi hanno dimostrato un beneficio per la salute pubblica derivante dalla disinfezione delle superfici ambientali come parte di un programma di controllo delle infezioni.

Nelle tabelle b e c allegate in Appendice si fornisce un quadro di sintesi sul livello di attività dei disinfettanti nei confronti degli agenti infettivi e sulle tipologie di disinfettanti impiegabili per superfici semi-critiche o scarsamente critiche.

8. Il controllo della contaminazione microbiologica su superfici di ambienti di lavoro nell'esperienza del laboratorio di prevenzione dell'Agenzia della Tutela della Salute (ATS) della Brianza

Eleonora Masala e Anna Molinari, ATS della Brianza, *Laboratorio di Prevenzione*

a) Il monitoraggio ambientale a supporto del controllo degli alimenti: analisi microbiologiche dei tamponi di superficie nelle industrie alimentari

Poiché le condizioni degli ambienti dove vengono prodotti gli alimenti possono influire in maniera importante sulla loro qualità igienica, il controllo dell'efficacia delle pratiche di pulizia delle superfici e delle attrezzature utilizzate nella produzione riveste un ruolo fondamentale nella prevenzione delle malattie trasmesse da alimenti.

Anche i regolamenti comunitari sottolineano l'importanza, ai fini della verifica del rispetto dei criteri, di prelevare campioni dalle aree di produzione e manipolazione degli alimenti; in particolare il regolamento (CE) n. 2073/2005 e s.m.i. sui "criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari" indica la ricerca di *Listeria monocytogenes* nei settori di produzione di alimenti pronti per il consumo che, potendo essere contaminati da tale microrganismo, costituiscono un rischio per la salute pubblica.

Il Laboratorio di Prevenzione dell'ATS della Brianza ha introdotto l'analisi di tamponi ambientali nelle zone di produzione e manipolazione degli alimenti, effettuati su superfici e attrezzature, per la valutazione della contaminazione residua dopo la loro sanificazione.

Il controllo microbiologico delle superfici ha da sempre supportato, e tuttora supporta, l'attività di controllo dei servizi competenti dell'ATS che, in sede di verifiche presso gli operatori del settore alimentare, effettuano non solo campionamenti di matrici alimentari, ma anche di piani di lavoro e attrezzature, secondo modalità e con materiali forniti dal laboratorio.

Per molti anni le analisi sono state effettuate anche su richiesta di privati in ambito di autocontrollo; in più di un caso i risultati del controllo delle superfici sono stati determinanti nell'individuare problemi di contaminazione riscontrati negli alimenti, dovuti all'utilizzo di pratiche di sanificazione non efficaci o scorrette.

Per quanto riguarda i metodi di campionamento il riferimento normativo è costituito dalla norma ISO 18593:2004 - *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs*, nella quale è descritto l'uso delle piastre a contatto, dei tamponi e delle spugnette (*sponge-bag*).

A fronte di uno studio di confronto condotto tra i diversi metodi, il Laboratorio ha deciso di utilizzare di routine il metodo *sponge-bag* (Figura 7) in quanto esso permette di campionare una superficie ampia (di norma 10x10 cm), di effettuare la determinazione di diversi parametri microbiologici sullo stesso campione, e di evitare problemi legati al fatto che superfici particolarmente umide influiscano sulla crescita dei

batteri determinando fenomeni di sciamatura o crescita di colonie sovrapposte che ne rendono difficile il conteggio.



Figura 7 - Campionamento con la metodica *sponge-bag*

I parametri microbiologici che di norma vengono determinati sui tamponi di superficie effettuati nelle zone di produzione e manipolazione degli alimenti sono:

- **Conta dei microrganismi aerobi mesofili a 30°C** (metodo di riferimento ISO 4833-1:2013), quale indicatore generico di contaminazione;
- **Conta di Enterobatteriacee** (metodo di riferimento ISO 21528-2:2004) quale indicatore più specifico in termini di igiene, dato che a questa famiglia appartengono numerosi microrganismi di cui alcuni di origine ambientale e altri di origine fecale;
- **Ricerca di *Listeria monocytogenes*** (metodo di riferimento ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004) quale microrganismo patogeno responsabile di malattie a trasmissione alimentare dovute a contaminazione secondaria data la sua notevole capacità di sopravvivenza nell'ambiente soprattutto a causa della sua elevata psicrofilia.

Quando ritenuto necessario, per esempio in occasione di indagini ambientali nel corso di episodi di malattia a trasmissione alimentare, oltre a queste determinazioni vengono effettuate le analisi per la ricerca di altri microrganismi, sia indicatori di contaminazione che patogeni.

Il laboratorio ha richiesto e ottenuto l'accreditamento di diversi metodi per l'analisi microbiologica di campioni ambientali prelevati nell'area di produzione e manipolazione degli alimenti (Conta dei microrganismi aerobi mesofili a 30°C; conta di Coliformi; conta di Enterobatteriaceae; conta di *Bacillus cereus* presunto; ricerca di *Salmonella* spp.; ricerca di *Escherichia Coli* produttori di tossina Shiga like (STEC)). I metodi utilizzati fanno riferimento a normative ISO il cui campo di applicazione comprende alimenti e tamponi ambientali. Fa eccezione la norma ISO per la ricerca di *Listeria monocytogenes* che ha come campo di applicazione esclusivamente matrici alimentari; il laboratorio tuttavia utilizza il metodo, per quanto non accreditato, ed

effettua la ricerca di questo microorganismo per la sua implicazione nelle contaminazioni di origine ambientale.

Per quanto riguarda i criteri di valutazione delle condizioni igieniche dell'ambiente sulla base degli esiti di analisi microbiologiche di tamponi di superficie, la normativa è disponibile solo per ambienti particolari (es. sale operatorie) e non per gli ambienti di produzione di alimenti.

"Per questo il laboratorio, sulla base della valutazione" delle serie temporali dei dati provenienti dal monitoraggio in regime di autocontrollo e dal controllo ufficiale di "10 anni di attività, ha definito delle classi di contaminazione" cui rapportarsi per dare poi una valutazione qualitativa dell'entità della contaminazione delle superfici indagate. In particolare le classi di contaminazione sono state calcolate definendo i valori minimi, medi e massimi dei dati raccolti dopo l'applicazione delle procedure di sanificazione.

Il giudizio associato alle classi di contaminazione identificate come descritto è stato concordato con il servizio Asl responsabile dei controlli ufficiali, associando a un certo livello di contaminazione i dati di qualità igienico sanitaria complessiva riscontrata nelle strutture oggetto di indagine.

È stato così possibile elaborare un modello che attualmente viene applicato ad ogni struttura per la valutazione qualitativa del "grado di pulizia" in base al quale è possibile esprimere un giudizio sull'efficacia delle pratiche di sanificazione (Tabella 22). Chiaramente, pur conservando l'approccio metodologico, i livelli di carica associati alle classi di giudizio possono essere suscettibili di variazioni in funzione della tipologia degli ambienti indagati e dei dati raccolti.

Tabella 22 - Criteri di valutazione del grado di pulizia dopo sanificazione applicati sul territorio di competenza dell'Asl Lecco

Parametro	Grado di pulizia UFC/cm ²		
	Buono	Accettabile	Insufficiente
Conta batterica	≤ 100	> 100 - ≤ 500	> 500
Enterobatteriaceae	≤ 1	> 1 - ≤ 5	> 5

b) Il monitoraggio ambientale come strumento di verifica della sanificazione: l'esperienza presso un impianto di lavaggio e decontaminazione di contenitori riutilizzabili per la raccolta di rifiuti ospedalieri

Già da molti anni nell'ambito della gestione dei rifiuti si è manifestata, anche nel settore sanitario, la tendenza alla ricerca di metodologie alternative di smaltimento che comportino un minor impatto sull'ambiente e un minor peso economico per le aziende. Una soluzione tecnica, introdotta a tal fine per l'espletamento del servizio

di raccolta dei rifiuti speciali ospedalieri, è rappresentata dalla sostituzione dei contenitori in cartone a perdere con bidoni in polipropilene riutilizzabili; questa pratica riduce tra l'altro il rischio di infezioni e lesioni sia del personale sanitario che degli addetti alla raccolta e al trasporto dei rifiuti ospedalieri.

L'utilizzo di contenitori riciclabili richiede tuttavia l'attuazione di efficaci pratiche per la loro pulizia e disinfezione, al fine di renderne sicura la successiva manipolazione; è dunque indispensabile verificare l'efficacia dei processi di sanificazione e sterilizzazione cui sono sottoposti i contenitori attraverso un programma di monitoraggio che permetta di quantificare il livello di contaminazione microbica presente sulle superfici prima e dopo il trattamento.

Già dalla fine degli anni novanta il laboratorio è stato coinvolto in questa problematica da una ditta che ha realizzato sul territorio un impianto per il lavaggio e la decontaminazione di contenitori riutilizzabili, sfruttando il vapore prodotto da un inceneritore; fin dall'inizio della sua attività la ditta ha infatti commissionato al laboratorio il monitoraggio microbiologico dell'attività dell'impianto stesso.

Da allora a tutt'oggi il laboratorio effettua con cadenza mensile il prelievo, tramite *sponge-bag*, di superfici su un campione rappresentativo di contenitori prima del loro trattamento e all'uscita dall'impianto di lavaggio; la superficie campionata, definita tramite l'uso di un delimitatore, è pari a 10x10 cm. I campioni vengono poi sottoposti ad analisi microbiologica per la conta dei microrganismi aerobi mesofili a 30°C e delle muffe, quali generici indicatori di contaminazione.

Da qualche anno la ditta con cadenza annuale richiede un controllo allargato alla ricerca di specifici microrganismi, sia con ruolo di indicatori (enterobatteri, enterococchi, stafilococchi) sia di potenziali patogeni (*Staphylococcus aureus*).

I risultati ottenuti vengono espressi come UFC/cm²; le cariche microbiche ottenute (ossia la somma della carica batterica mesofila e della carica micetica) vengono inserite in classi di contaminazione che vanno dalla "crescita assente" in caso di assenza di microrganismi sia batterici che micetici, al grado basso (da 1 a 10), medio (> 10 - ≤ 100), alto (> 100 - ≤ 1000) ed elevato (> 1000). Questa classificazione è stata ottenuta con un approccio analogo a quello descritto nel paragrafo precedente ossia attraverso l'analisi delle serie temporali di dati raccolti in più di 10 anni di monitoraggio e attraverso il calcolo di: valori minimi che hanno permesso di identificare il *range* di contaminazione basso, medi che hanno permesso di identificare la classe di contaminazione intermedia e massimi che hanno permesso di identificare la classe di contaminazione alta. In un secondo momento si è valutata la necessità di suddividere ulteriormente quest'ultima classe in alta e molto alta, per discriminare meglio i risultati di contaminazione che, pur alti, presentano una maggiore frequenza di accadimento, da quelli molto alti che invece si verificano sporadicamente.

In linea generale la maggior parte delle superfici non sanificate mostra una contaminazione microbica di livello medio - basso o medio - alto il che indica un corretto utilizzo da parte degli operatori sanitari e riduce il rischio di incidenti per gli addetti al loro impiego; dopo il trattamento si ottiene, di norma, un abbattimento della carica

batterica iniziale. Il fatto che una certa percentuale di superfici risulti contaminata da miceti a seguito del trattamento è stata imputata in condizioni normali ad una contaminazione secondaria da parte dell'aria.

Nel complesso i risultati ottenuti confermano la validità del sistema; tuttavia solo interventi di verifica regolari e continuativi dell'esito del trattamento di sanificazione sulle superfici permettono di avere il pieno controllo del processo. Infatti, in alcuni casi, proprio grazie al controllo microbiologico effettuato è stato possibile identificare malfunzionamenti dell'impianto; in certi casi addirittura è stato possibile anche contribuire al miglioramento dell'efficacia dei trattamenti, per esempio negli studi di valutazione di nuovi detergenti.

c) Il monitoraggio ambientale come strumento di verifica della salubrità degli ambienti di vita e di lavoro

Le indagini ambientali per la valutazione della salubrità dei luoghi di vita e di lavoro rappresentano un'importante attività del laboratorio a supporto del servizio di Igiene e Prevenzione dell'Asl. Prevedono il campionamento di svariate matrici ambientali: aria; polvere; acqua di rete e non, da ultimo l'esecuzione di tamponi di superficie mediante la tecnica *sponge-bag* con o senza delimitatore.

I punti da sottoporre a campionamento vengono definiti a seguito del sopralluogo e della consultazione delle planimetrie dell'edificio e degli impianti. I risultati ottenuti dai tamponi sono valutati congiuntamente a quelli delle altre matrici ambientali e forniscono preziose informazioni circa la salubrità e l'efficienza impiantistica degli ambienti indagati.

Le tipologie di superfici campionate sono:

- **Condotti di distribuzione dell'aria nei punti di ispezione:** questi campionamenti hanno il fine di verificare l'efficacia degli interventi di pulizia programmata (in casi particolari il controllo viene effettuato prima e dopo l'effettuazione della pulizia); i parametri ricercati di norma sono la conta dei microrganismi aerobi mesofili a 30°C (CBT) e la carica micetica (CM). I ceppi batterici e micetici isolati vengono sottoposti a identificazione. Il confronto con le specie rinvenute nel bioaerosol degli ambienti serviti dall'impianto di aerazione permette di stabilire in che misura lo stato di pulizia dell'impianto incida sulla qualità dell'aria *indoor*.
- **Superfici degli ambienti in prossimità delle bocchette di distribuzione dell'aria:** anche in questo caso, di norma, si ricercano CBT a 30°C e CM. Molto importante l'identificazione delle specie micetiche: il confronto con quelle isolate dal bioaerosol e dalla polvere depositata negli interstizi consente di identificarne la possibile provenienza (attività antropica, impianti aeraulici) e stabilire le modalità più appropriate per la loro eliminazione.
- **Superfici/piani di lavoro destinati a particolari utilizzi:** in alcune tipologie di ambienti indagati (ad esempio centri estetici, spa, alberghi), nel corso delle ispezioni

può rendersi necessario valutare anche l'efficacia delle procedure di sanificazione adottate dal personale. In questo caso oltre a CBT e CM possono essere ricercati anche altri parametri quali stafilococchi, *Pseudomonadaceae*, Enterobatteriacee. Il campionamento viene effettuato (con o senza delimitatore a seconda della tipologia di superficie) prima e dopo le operazioni di sanificazione e al termine delle analisi viene calcolato il tasso di abbattimento, dato dal rapporto fra la concentrazione del parametro dopo la sanificazione e dello stesso prima della sanificazione. Sulla base dei dati storici si considerano accettabili tassi di abbattimento $\leq 0,1$ UFC/cm² per CBT e $\leq 0,3$ UFC/cm² per CM.

Le tipologie di campionamenti sono dettagliate nella Tabella 23 a pagina seguente.

Tabella 23 - Modalità di esecuzione dei tamponi di superfici per indagini ambientali e loro significato

Punti campionati	Parametri	Tamponi ambientali Analisi quantitativa (UFC/cm ²)	Analisi qualitativa (UFC/ml)	Identificazione specie batteriche e fungine	Bioareosol Analisi quantitativa (UFC/cm ³)	Identificazione specie batteriche e fungine	Significato
Condotti impianto di aerazione (aria in uscita da U.T.A.)	CBT a 30° C; CM	Sl ⁽¹⁾	Sl ⁽¹⁾	Sl ⁽¹⁾	Sl ⁽¹⁾	Sl ⁽¹⁾	Valutazione dello stato di manutenzione dei condotti. Le specie batteriche e micetiche rilevate mediante tamponi di superficie sono confrontate con quelle ottenute nel bioareosol usato come bianco (<i>outdoor</i>) per stabilire l'origine della contaminazione.
Ambienti <i>indoor</i>	CBT a 30° C; CM	Sl ⁽¹⁾	Sl ⁽¹⁾	Sl ⁽¹⁾	Sl ⁽¹⁾	Sl ⁽¹⁾	Valutazione dell'entità della deposizione del bioareosol. Il confronto delle specie micetiche e batteriche isolate dai tamponi superficiali e dal bioareosol consente di stabilire almeno per una parte di esse l'origine.
Piani di lavoro o superfici di ambienti <i>indoor</i> destinati ad utilizzi particolari	CBT a 30° C; CM; parametri specifici a seconda della destinazione della superficie (es. stafilococchi; <i>Enterobacteriaceae</i> ; <i>Pseudomonadaceae</i> , ecc.)	Sl ⁽¹⁾	Sl ⁽¹⁾	Sl ⁽¹⁾	Sl ⁽¹⁾	Sl ⁽¹⁾	Valutazione efficacia procedure di sanificazione: calcolo tasso di abbattimento per parametro: CBT accettabile se $\leq 0,1$; tasso di abbattimento CM accettabile se $\leq 0,3$

(1) La modalità di espressione del risultato varia in funzione della possibilità di delimitazione della superficie campionata.



9. Conclusioni

L'analisi della letteratura scientifica, della normazione tecnica e delle linee di indirizzo nazionali e internazionali in materia di controllo microbiologico delle superfici è stata condotta con l'intento di conoscere lo stato dell'arte in materia e di reperire, se possibile, indicazioni operative, indici e/o criteri applicabili trasversalmente nei diversi contesti di lavoro. Questi sarebbero di grande utilità a quanti effettuano campionamenti microbiologici su superfici o valutano i risultati dei monitoraggi ai fini della tutela della salute dei lavoratori e del mantenimento di condizioni igieniche ambientali adeguate.

Per quanto concerne lo stato dell'arte in materia, desumibile dai documenti consultati, si possono evincere le seguenti considerazioni:

- a) In linea generale, gli ambiti lavorativi affrontati dalla letteratura scientifica e dalla normazione tecnica in materia sono risultati principalmente due: "Farmaceutico-Sanitario" e "Alimenti e mangimi per animali".

Molti lavori scientifici sono incentrati sul settore ospedaliero, dove la problematica della contaminazione microbiologica delle superfici e delle attrezzature è particolarmente sentita.

Nel 1968 Spaulding distinse, in ambito nosocomiale, tre tipologie di superfici ambientali in funzione del rischio di infezione (superfici critiche, semi-critiche e non critiche) e ai fini dell'individuazione dei requisiti di pulizia o di sterilità da adottare (cfr. Tabella 21).

Il ruolo svolto dalle superfici nella trasmissione di microrganismi patogeni ai pazienti è stato confermato dal riscontro della presenza di agenti responsabili di infezioni nosocomiali sulle superfici ambientali delle stanze di degenza e dall'evidenza che pulizia e disinfezione riducono l'incidenza delle infezioni correlate all'assistenza.

I lavoratori che svolgono la propria attività in ambiente sanitario sono anch'essi esposti al rischio infettivo, a causa dell'elevata resistenza ambientale dei patogeni, della loro bassa dose infettante e potendo entrare in contatto con agenti infettivi presenti anche su superfici.

Per controllare tale rischio, normalmente vengono realizzati monitoraggi microbiologici di aria, acqua (sistemi idro-sanitari e di condizionamento) e superfici ambientali di sale operatorie, reparti ospedalieri, unità di emodialisi, terapie intensive ecc. Le indagini sono generalmente limitate alla carica batterica totale e/o alla ricerca di specie batteriche comunemente responsabili di infezioni nosocomiali.

Valori di riferimento per la valutazione dei risultati dei monitoraggi microbiologici su superfici del reparto operatorio sono contenuti nelle Linee guida Ispesl, 2009. Altri valori sono contenuti nell'*Annex I* dell'EU GMP Guide 2008, attinente alle aree di fabbricazione medicinali per uso umano e veterinario.

Nel settore farmaceutico-sanitario, tuttavia, le norme tecniche che trattano di superfici prendono in considerazione aspetti inerenti alla pulizia e all'igiene degli ambienti ai fini della sicurezza e sterilità dei prodotti o dei pazienti e solo indirettamente coinvolgono la tutela della salute del lavoratore, che svolge la sua attività in tali contesti di lavoro.

Nel settore della microbiologia dei prodotti destinati all'alimentazione umana ed animale le norme tecniche sul campionamento sono finalizzate alla prevenzione dei pericoli di contaminazione degli alimenti nelle fasi di lavoro che possono rappresentare un punto critico per la qualità dell'alimento stesso e, anche in questo caso, non sono direttamente finalizzate alla protezione dei lavoratori del settore. Tutte le suddette indicazioni, comunque, poiché elaborate per la sicurezza di pazienti e/o prodotti, possono senza dubbio costituire un valido riferimento anche per la salute e sicurezza degli stessi lavoratori.

- b) Relativamente alle metodologie di indagine utilizzabili per il campionamento microbiologico su superfici, l'impiego del metodo delle piastre a contatto è risultato molto diffuso per la facilità d'utilizzo. Le piastre a contatto sembrano, inoltre, più sensibili al recupero di batteri Gram-positivi rispetto ai Gram-negativi su superfici di ambienti ospedalieri (Lemmen *et al.*, 2001). Una limitazione all'uso di tale metodo è data dall'impossibilità di raggiungere punti critici quali angoli o curvature delle superfici e di utilizzo su superfici non lisce. Inoltre, in caso di presenza di carica batterica molto alta, sussiste il rischio di sottostimare il livello di contaminazione, a causa dell'aggregazione dei batteri sulla superficie e della confluenza delle colonie da conteggiare sulla piastra.

L'uso di tamponi è largamente diffuso nel settore alimentare, ma anche in quello sanitario, in cui risulta preferibile all'impiego delle piastre per la ricerca di stafilococchi aurei meticillina resistenti (MRSA), enterococchi vancomicina resistenti (VRE) e batteri Gram-negativi multiresistenti (Lemmen *et al.*, 2001). I tamponi permettono di effettuare il campionamento microbiologico anche su superfici difficili da raggiungere, come rubinetti e tubature, o lungo le testiere dei letti delle stanze di degenza. Questa metodologia viene prescelta per campionare su superfici lisce non porose, come quelle di acciaio, pareti dipinte, piastrelle, laminati di legno ecc. I tamponi in nylon, in particolare, consentono una maggiore efficienza di recupero delle cellule microbiche, in quanto i microrganismi non penetrano all'interno della matrice di nylon, come avviene invece nei tamponi in cotone, ma rimangono sulla superficie esterna.

La metodica *sponge-bag* è molto utilizzata per la valutazione dello stato igienico delle superfici nel settore alimentare. Rispetto al metodo del tampone, tale me-

todica ha il vantaggio di consentire il prelievo su superfici più ampie e di assicurare una maggiore efficienza di recupero in presenza di biofilm o screpolature, perché è possibile esercitare una maggiore pressione. Il metodo non è adatto per superfici di piccole dimensioni.

La tecnica della bioluminescenza (ATP) è stata sempre di più adottata per monitorare lo stato di pulizia delle superfici di vari settori lavorativi, in particolare nel campo dell'HACCP, per la possibilità di ottenere risultati validi in pochi minuti, a differenza dei giorni necessari per l'esecuzione di test microbiologici. Negli ospedali tale tecnica ha trovato impiego nella valutazione del grado di inquinamento microbiologico sulle superfici dello strumentario e degli ambienti. Tale metodica, tuttavia, può essere considerata solo uno *screening* iniziale di tipo quantitativo dell'inquinamento microbiologico presente: infatti, per poter discriminare il tipo e la specie di contaminante/patogeno presente, l'uso del bioluminometro deve essere integrato con analisi di tipo microbiologico. Per tale motivo, in diversi lavori si raccomanda il monitoraggio integrato del livello di pulizia delle superfici attraverso la tecnica dell'ATP bioluminescenza, la valutazione visiva e l'analisi microbiologica.

- c) Non sono stati reperiti lavori in cui sono suggeriti "indici" di contaminazione microbiologica delle superfici del tipo di quelli proposti per valutare la qualità dell'aria *indoor* (*European Collaborative Action*, 1993; Dacarro *et al.*, 2000, ACGIH, 1999 ecc.); per i criteri di valutazione della contaminazione, si rimanda alle tabelle comparative riportate nei Capitoli 3 e 6. Nella maggior parte dei lavori di letteratura consultati, inoltre, i riferimenti proposti sono destinati solo a valutare l'efficacia delle azioni di sanificazione condotte.

In ambienti ospedalieri, il rinvenimento di una concentrazione batterica $< 2,5$ UFC/cm² su superfici di letti, sedie, tavoli, arredi vari e l'assenza dello *Staphylococcus aureus* (considerato come organismo indicatore della contaminazione da patogeni) sono proposti da alcuni autori come *benchmark* per il rischio infettivo (Amodio *et al.* 2014). Lo stesso valore di concentrazione è stato proposto anche come riferimento per valutare l'efficacia degli interventi di pulizia (Malik *et al.*, 2003).

L'impiego della metodologia tradizionale (metodo colturale delle piastre a contatto) è stato confrontato con quello dell'ATP bioluminescenza (Aycicek *et al.*, 2006; Mulvey *et al.*, 2011; Amodio *et al.*, 2014; Azizkhan, 2014): secondo alcuni autori, concentrazioni microbiche $< 2,5$ UFC/cm² sono risultate associabili a corrispondenti valori di ATP bioluminescenza pari a 100, 250 e 500 RLU. Secondo altri, invece, la presenza di materiale organico (sporizia, residui di alimenti) sulle superfici può comportare la non comparabilità tra i risultati ottenuti utilizzando entrambe le metodiche.

Infine, il valore di concentrazione microbica totale < 5 UFC/cm² è stato proposto come il riferimento per superfici ospedaliere sottoposte a frequenti contatti (Dancer, 2004) e per la valutazione dell'igiene delle attrezzature impiegate per la produzione del cibo (*Swedish Food Standard Agency- Swedish code of statute SLVSFS*, 1998).

I risultati della *review* bibliografica condotta dimostrano che, ai fini del controllo della contaminazione microbiologica sulle superfici, non è al momento possibile disporre né di una procedura operativa standard applicabile trasversalmente a tutti i comparti lavorativi, né di valori di riferimento rispetto ai quali esprimere un giudizio di accettabilità o meno dei risultati dei campionamenti condotti. Una proposta di procedura adottabile è presente nelle Linee guida Inail sul *Monitoraggio microbiologico degli ambienti di lavoro* (Inail, 2010).

In conclusione, a fronte della disponibilità sul mercato di un'ampia gamma di tecniche e metodologie di indagine diverse, ognuna con i suoi vantaggi e i suoi limiti di impiego, la scelta della metodologia da adottare risulta determinata dalle sole caratteristiche delle superfici da esaminare (lisce o meno, ampie o limitate ecc.) e dagli obiettivi dell'indagine (protezione del prodotto o dell'alimento, verifica degli interventi di pulizia effettuati ecc.), indipendentemente dal tipo di ambiente di lavoro in esame. Ciò nonostante, la normativa tecnica consultata consente di trarre indicazioni e criteri utili, rispetto ai quali impostare e realizzare un sistema di autocontrollo delle condizioni igieniche ambientali e, in particolare, delle superfici.

Tali elementi, che potrebbero essere applicati trasversalmente ai vari contesti lavorativi, sono riassunti nell'elenco che segue. Presupposto imprescindibile è l'aver effettuato una corretta valutazione del rischio biologico ai sensi del d.lgs. 81/2008 e s.m.i.

- In esito alla valutazione dei rischi, individuare le fasi di lavoro a rischio biologico (graduandone i livelli) e le aree/zone critiche (superfici più esposte alla contaminazione) a esse associate.
- All'interno di ogni area/zona, definire i punti critici o di controllo (ovvero i siti dove effettuare il campionamento), nei quali sia possibile intervenire per ridurre o eliminare la contaminazione. È possibile individuare tali punti effettuando una serie di campionamenti nell'area critica nel corso dell'attività di lavoro e misurando i livelli di contaminazione.
- Effettuare serie temporali di campionamenti e analisi nei punti critici e rappresentare graficamente i dati per desumerne il *trend* temporale. In base al trend, definire le "classi di contaminazione" cui rapportarsi (ad es. bassa, media, alta), associando a ogni classe un giudizio igienico (ad es. buono, accettabile, insufficiente).
- Per verificare l'efficacia di un prodotto sanificante (tasso di abbattimento della contaminazione) rispetto a un altro, confrontare i livelli di contaminazione misurati prima con quelli misurati dopo l'intervento di sanificazione effettuato con ciascun prodotto, alle normali concentrazioni d'uso.
- Effettuare il campionamento quando l'area critica è operativa e al massimo della sollecitazione (ad es. a fine turno o durante il picco dell'attività lavorativa).
- Raccogliere un numero di campioni rappresentativo.
- Dichiarare sempre l'approccio (tecnica, procedura) adottato.

10. Allegati

a) Vie di trasmissione degli agenti infettivi

Le vie di accesso di un microrganismo all'ospite sono sinteticamente riconducibili a 5 tipi:

1. **Ingestione.** A questa tipologia appartengono le infezioni a circuito oro-fecale, acquisite attraverso cibi o bevande contenenti l'agente infettivo e sono generalmente indice di un basso tenore igienico-sanitario (tifo, paratifo, shigellosi, brucellosi, epatite A ed E, ecc.). A questa via di trasmissione sono riconducibili anche alcune intossicazioni alimentari dovute ad esotossine batteriche quali la tossina botulinica (prodotta da *Clostridium botulinum*) e l'enterotossina stafilococcica (prodotta da *Staphylococcus aureus*).
2. **Inalazione.** I microrganismi possono accedere alle vie respiratorie con le polveri o gli aerosol sospesi nell'atmosfera, prodotti sia naturalmente che a seguito delle attività d'impianti civili e industriali, oppure attraverso le goccioline di Flügge emesse dall'uomo per nebulizzazione in seguito a starnuti, tosse o con il parlare. Solamente le particelle di aerosol denominate "droplet nuclei" con diametro < 5 µm hanno la capacità di raggiungere il profondo tratto respiratorio (in quanto non trattenute dalle vibrisse nasali o espulse dal movimento muco-ciliare dell'epitelio respiratorio) e quindi veicolare efficientemente i microrganismi. Un gran numero di agenti infettivi diversi, sia virus che batteri e funghi, sono trasmessi all'uomo attraverso aerosol (virus influenzali, parainfluenzali, del morbillo, della varicella, della mononucleosi, della SARS, oltre a *Mycobacterium tuberculosis*, *Bordetella pertussis* e *Mycoplasma pneumoniae*, ecc.), tutti a trasmissione interumana. Per altri patogeni la fonte d'aerosol è squisitamente ambientale, come nel caso delle legionellosi, trasmesse da aerosol generati per nebulizzazione di acque contaminate contenenti *Legionella pneumophila*, il carbonchio polmonare causato dall'inalazione di spore di *Bacillus anthracis*, la melioidosi acquisita per inalazione di terriccio polverulento contenente *Burkholderia pseudomallei*, o le varie forme di aspergillosi polmonare, causate dall'inalazione dei conidi del fungo *Aspergillus fumigatus*.
3. **Penetrazione percutanea.** Lesioni delle superfici corporee (cute, mucose), per effetto di micro-ferite, traumi accidentali e indotti (ad esempio da interventi chirurgici) possono costituire la porta di accesso per vari microrganismi presenti nell'ambiente, altrimenti incapaci di infettare l'ospite (ad esempio *Clostridium tetani*, il carbonchio cutaneo, la melioidosi) e le infezioni da puntura/ferita chirurgica

sostenute da vari batteri ambientali patogeni opportunisti (ad esempio *Pseudomonas aeruginosa*) o da virus (ad esempio HIV, HBV, HCV).

4. **Inoculazione.** Numerosi agenti infettivi sono trasmessi attraverso l'iniezione diretta del microrganismo in un tessuto o nel circolo ematico a seguito di punture di artropodi ematofagi o di morsi di animali che rappresentano gli ospiti intermedi del patogeno e i vettori dell'infezione. Le zoonosi sono trasmesse attraverso questa modalità, e la diffusione di queste malattie è strettamente correlata all'area geografica di diffusione del vettore (varie rickettsiosi, le borreliosi, fra le quali spicca la malattia di Lyme, oltre a malaria e a numerose infezioni virali).
5. **Contagio sessuale.** Alcuni patogeni hanno sviluppato meccanismi di adattamento all'ospite che consentono loro una trasmissione attraverso l'atto sessuale (i papillomavirus, il virus *Herpes simplex*, il virus dell'epatite B- HBV, l'HIV, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, il micete *Candida albicans*, il protozoo *Trichomonas vaginalis*, ecc.)

Il processo infettivo

Per quanto concerne le interazioni tra patogeni ed ospite, l'intero processo infettivo può essere schematizzato in tre fasi. Dapprima si ha il contagio o l'acquisizione, poi si ha la fase della diffusione e infine si avrà la malattia, intesa come l'espressione manifesta dell'infezione nell'ospite. La malattia è un processo multifattoriale dovuto agli effetti dannosi di particolari patogeni e alla reattività del sistema immunitario dell'ospite nei confronti dell'agente infettante.

I fattori importanti che intervengono nella catena dell'infezione vengono di seguito descritti.

- **Agente patogeno:** virus, batterio, micete, parassita.
- **Trasmissione:** passaggio dell'agente patogeno dalla sorgente all'ospite.
- **Sorgente d'infezione:** può essere costituita o da mezzi animati, uomo o animale malato, oppure inanimati, acqua-alimenti-oggetti.
- **Infettività:** attitudine di un patogeno a diffondersi dalla sorgente all'ospite.
- **Dose infettante (o carica microbica):** quantità di agenti microbici capace di causare infezione.
- **Periodo di incubazione:** periodo di tempo che intercorre tra ingresso del patogeno e insorgenza di sintomi clinici della malattia.
- **Ospite:** soggetto suscettibile all'infezione.
- **Soggetto portatore:** ospite che non mostra sintomi, ma elimina l'agente patogeno.
- **Trasmissione diretta:** passaggio per contatto diretto tra soggetto infetto, malato, portatore e soggetto sano recettivo.
- **Trasmissione indiretta:** passaggio tramite veicoli, come acqua, alimenti, utensili, strumenti sanitari, sangue, siero, oppure vettori (artropodi).

b) Attività dei disinfettanti

Principio attivo	Spettro d'azione	Livello di attività	Note
Aldeide glutarica 2%	Gram-positivi: +++ Gram-negativi: +++ Miceti: ++ Virus: ++ Spore: ++ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : +	ALTO	<p>Eccellente attività biocida (ma effetto lento su micobatteri e spore); è attiva in presenza di materiale organico, non è corrosiva.</p> <p>Presenta problematiche di tipo tossicologico (azione irritante a livello respiratorio e cutaneo, azione sensibilizzante) che ne limitano l'utilizzo, soprattutto in gestione manuale. Non è idoneo all'impiego sui tessuti viventi.</p> <p>L'eliminazione del disinfettante dopo l'uso deve essere fatta in accordo con i regolamenti locali.</p>
Ortoftaldeide 0,55%	Gram-positivi: +++ Gram-negativi: +++ Miceti: ++ Virus: ++ Spore: ++ <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : +	ALTO	<p>Pur mantenendo inalterata l'efficacia biocida tipica delle altre aldeidi, presenta dei vantaggi rispetto a queste per la maggiore facilità d'utilizzo.</p>
Acido peracetico 0,2%	Gram-positivi: +++ Gram-negativi: +++ Virus: ++ Micobatteri: ++ Spore: ++	ALTO	<p>Alcuni micobatteri risultano essere resistenti.</p> <p>Possono essere inattivati da materiale organico.</p> <p>Vista la variabilità dei preparati in commercio è indispensabile controllare la scheda tecnica e di sicurezza fornita dal produttore.</p>
Perossido d'idrogeno	Gram-positivi: ++ Gram-negativi: +++ Micobatteri: +/- Miceti: + Virus lipofili: + Virus idrofili: + Spore: -	ALTO (conc. 6%) BASSO (conc. 3%)	<p>Soluzioni concentrate di perossido d'idrogeno (6% ed oltre) sono estremamente reattive, ossidanti e corrosive. Viene utilizzato nel processo di sterilizzazione per dispositivi medici tramite autoclavi al gas plasma. È un potente biocida sui materiali inanimati, ma ha un'attività molto più blanda sui tessuti viventi.</p>

La contaminazione microbiologica delle superfici negli ambienti lavorativi

Principio attivo	Spettro d'azione	Livello di attività	Note
Cloroderivati	Gram-positivi: +++ Gram-negativi: +++ Micobatteri: ++ Miceti: + Virus lipofili: ++ Virus idrofilo: ++ Spore: ++ (in particolari condizioni d'uso)	ALTO* INTERMEDIO	*L'attività disinfettante dipende dalla % di cloro disponibile. I micobatteri necessitano di percentuali elevate di cloro disponibile (circa 5000 ppm). Alcune specie sporigene come il <i>Clostridium tetani</i> necessitano sia di concentrazioni elevate che di tempi di contatto prolungati.
Alcoli (70-90%)	Gram-positivi: +++ Gram-negativi: +++ Micobatteri: +/- Miceti: ++ Virus lipofili: ++ Virus idrofilo: +/- Spore: - (virus HIV +++)	INTERMEDIO	Le miscele al 70% in peso di alcool sono quelle che espletano la maggiore attività. Germicida. Le miscele in cui l'alcool ha concentrazioni inferiori al 59% in peso, hanno scarsa efficacia disinfettante. L'alcool denaturato può essere usato solo come solvente e detergente.
Polifenoli (alcune formulazioni)	Gram-positivi, Gram-negativi, virus lipofili (compresi HBV, HCV, HIV) e sul bacillo di Koch	INTERMEDIO/ BASSO	Disponibili sul mercato diverse associazioni fenoliche con detergente che presentano differenti profili di attività (intermedio/bassa).
Iodofori	Gram-positivi: +++ Gram-negativi: +++ Virus e Miceti: ++ Micobatteri: ++ Spore: + L'attività nei confronti del <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , delle spore batteriche è condizionata dal tempo di contatto e dalla concentrazione	INTERMEDIO	Gli iodofori registrati come disinfettanti sono prodotti dotati di livello di attività intermedio.
Clorexidina	Gram positivi: +++ Gram negativi: ++ Micobatteri: + /- Virus lipofili: + Miceti: +	BASSO	Resistenze accertate: <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Proteus</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Burkholderia</i> spp.

Principio attivo	Spettro d'azione	Livello di attività	Note
	Virus idrofili: - Spore: -		L'associazione con sale di ammonio quaternario (cetrimide) porta ad un prodotto con buona azione battericida e ottime capacità detergenti.
Sali di ammonio quaternario	Gram positivi: ++ Gram negativi: + Micobatteri: - Miceti: +/- Virus lipofili: - Virus idrofili: - Spore: -	BASSO	Sono scarsamente attivi su alcuni miceti e su diversi Gram-negativi. Mancanza di attività sporigena, micobattericida e virucida. Inattivi sullo <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Inattivati da materiale organico. Non miscelare mai i composti d'ammonio quaternari con i normali detergenti.

Legenda:

+++ molto buona; ++ buona; + scarsa; +/- molto scarsa; - pessima.

c) Disinfettanti per superfici ambientali semicritiche (a) o scarsamente critiche (b)





Principio attivo	(a)	(b)	Note
			<p>(a) Semicritiche: superfici a diretto contatto con paziente infetto o a rischio di acquisire infezione o comunque superfici "ad alto rischio di contatto" che possono contribuire, in via indiretta, alla trasmissione di microrganismi.</p> <p>(b) Scarsamente critiche: superfici difficilmente coinvolte nel trasferimento di microrganismi, quali pavimenti o pareti.</p>
DERIVATI DEL CLORO (500 - 1.000 ppm)	si	si	<p>Nella disinfezione ambientale i derivati del cloro, grazie all'ampio spettro e all'azione rapida e nonostante l'importante interferenza da parte del materiale organico, sono utili sia in interventi di <i>routine</i> sia in caso di contaminazione. La concentrazione d'uso consigliata varia in rapporto alla quantità di materiale organico presente sulla superficie da trattare (generalmente 500-1.000 ppm, ma 5.000 ppm e oltre se contaminazione importante): 5% per ambienti puliti, 10% per ambienti medio contaminati, 50% per ambienti molto contaminati o concentrazioni ancora maggiori per la decontaminazione in presenza di sangue.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Prodotto per piani di lavoro e superfici di apparecchiature, in quanto indicato per dispositivi medici • Ha ottima attività antivirale • È facilmente inattivato dal materiale organico, specialmente proteico • Non utilizzare su superfici metalliche.
DERIVATI FENOLICI	si	si	<p>La concentrazione d'uso è 0,5% - 1%, secondo il tipo di prodotto.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lo spettro d'azione è piuttosto ampio • Non è inattivato da materiale organico • Disinfezione e lavaggio di pavimenti, pareti e piani di lavoro. <p>Risultano utili soprattutto nell'ambito della decontaminazione e del trattamento ambientale.</p>
CLOREXIDINA 1,5%+CETRIMIDE 15%		si	<p>Diluito al 3% è indicato per la disinfezione di superfici non trattabili con derivati del cloro o derivati fenolici.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Spettro d'azione limitato • All'1% è indicato per la detersione-disinfezione delle culle termostatiche.
ALCOL 70%		si	<p>Viene inattivato in modo importante dal materiale organico eventualmente presente.</p> <ul style="list-style-type: none"> • L'elevata volatilità non consente, in genere, di garantire tempi di contatto efficaci nel trattamento di superfici. • Ottime le proprietà solventi/pulenti.

È di particolare importanza la frequenza con cui viene fatto l'intervento.




- Il trattamento con disinfettante dovrebbe essere preceduto da accurata detergenza. Infatti la rimozione meccanica dello sporco è intervento sicuramente efficace per abbattere la carica microbica. In alternativa si può prendere in considerazione l'uso di un prodotto detergente-disinfettante.
- L'aspetto più critico del trattamento delle superfici è la difficoltà di garantire un efficace tempo di contatto; il semplice strofinamento non consente al disinfettante di esplicare appieno la sua attività.

d) Classificazione CLP dei principi attivi dei disinfettanti

Fonte: (www.echa.europa.eu)

Disinfettanti	Settori di utilizzo	Classificazione CLP (Classificazione, etichettatura e imballaggio) (CE) 1272/2008
Acido peracetico CAS 79-21-0	Disinfezione ospedaliera Industria alimentare	 H226; H242; H302; H312; H314; H 332; H 400; H335
Aldeide glutarica CAS 111-30-8	Disinfezione ospedaliera	 H301; H314; H317; H331; H334; H400
Perossido d'idrogeno CAS 7722-84-1	Disinfezione ospedaliera Industria alimentare	 H271: $C \geq 70 \%$ H272: $50 \% \leq C < 70 \%$ H314: $C \geq 70 \%$ H314: $50 \% \leq C < 70 \%$ H315: $35 \% \leq C < 50 \%$ H318: $8 \% \leq C < 50 \%$ H319: $5 \% \leq C < 8 \%$ H335: $C \geq 35 \%$
Derivati fenolici	Disinfezione ospedaliera	<p style="text-align: center;">Orto-fenilfenolo</p>  H319; H315; H335; H400

La contaminazione microbiologica delle superfici negli ambienti lavorativi

Disinfettanti	Settori di utilizzo	Classificazione CLP <i>(Classificazione, etichettatura e imballaggio)</i> <i>(CE) 1272/2008</i>																																																	
		<p>Para cloro meta cresolo</p>  <p>H302; H312; H318; H317; H400</p> <p>Ortobenzil-para-clorofenolo</p>  <p>H332; H315; H318; H317; H373; H400</p>																																																	
Soluzioni di cloro attivo	Disinfezione ospedaliera Industria alimentare	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="7">Soluzioni con parte di cloro attivo:</th> </tr> <tr> <th>≥0.25%</th> <th>≥1%</th> <th>≥2.5%</th> <th>≥3%</th> <th>≥5%</th> <th>≥10%</th> <th>≥25%</th> </tr> <tr> <th><1%</th> <th><2.5%</th> <th><3%</th> <th><5%</th> <th><10%</th> <th><25%</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="7">SGH (Classificazione attuale)</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>H412</td> <td>Attenzione H315 H319 H412</td> <td>Attenzione H315 H319 H400 H411</td> <td>Pericolo H315 H318 H400 H411</td> <td>Pericolo H290 H314 H400 H411 EUH031</td> <td>Pericolo H290 H314 H400 H411 EUH031</td> <td>Pericolo H290 H314 H400 H410 EUH031</td> </tr> </tbody> </table>	Soluzioni con parte di cloro attivo:							≥0.25%	≥1%	≥2.5%	≥3%	≥5%	≥10%	≥25%	<1%	<2.5%	<3%	<5%	<10%	<25%		SGH (Classificazione attuale)																					H412	Attenzione H315 H319 H412	Attenzione H315 H319 H400 H411	Pericolo H315 H318 H400 H411	Pericolo H290 H314 H400 H411 EUH031	Pericolo H290 H314 H400 H411 EUH031	Pericolo H290 H314 H400 H410 EUH031
Soluzioni con parte di cloro attivo:																																																			
≥0.25%	≥1%	≥2.5%	≥3%	≥5%	≥10%	≥25%																																													
<1%	<2.5%	<3%	<5%	<10%	<25%																																														
SGH (Classificazione attuale)																																																			
H412	Attenzione H315 H319 H412	Attenzione H315 H319 H400 H411	Pericolo H315 H318 H400 H411	Pericolo H290 H314 H400 H411 EUH031	Pericolo H290 H314 H400 H411 EUH031	Pericolo H290 H314 H400 H410 EUH031																																													
Clorexedina		 <p>H318; H410</p>																																																	

11. Glossario

Antisepsi

È l'insieme delle procedure che determinano l'arresto della crescita dei microrganismi, presenti su tessuti viventi, attraverso una loro inibizione o distruzione. L'antisepsi si attua con mezzi chimici (antisettici). Il termine antisettico di solito si usa per sostanze germicide che vengono impiegate su tessuti viventi e che pertanto devono essere compatibili, a seconda dei casi, con cute integra, cute lesa, mucose e non devono presentare caratteristiche di tossicità acuta o cronica.

Asepsi

Situazione in cui si ha completa assenza di microrganismi viventi, raggiungibile con la sterilizzazione.

Battericida o germicida

Agente fisico o chimico in grado di uccidere microrganismi in fase vegetativa (batteri, miceti, virus).

Benchmark

Obiettivo di concentrazione microbica da raggiungere. Comprende "valori *target*" e "valori di allerta".

Biocida

È una sostanza che uccide gli organismi viventi, patogeni e non.

Carica microbiologica (*bioburden*)

Popolazione di microrganismi vitali presenti su un prodotto e/o su una confezione prima del trattamento di sterilizzazione (definizione tratta da UNI EN 556).

Contaminazione

Presenza transitoria di un agente infettivo su una superficie corporea, su indumenti, effetti lettereschi, strumenti e altri oggetti inanimati, oppure sostanze alimentari e cibi in genere. Non è presente invasione dei tessuti o reazione dell'organismo ospite.

Decontaminazione

La decontaminazione consta in un'elevata riduzione della carica microbica su mate-

riali o superfici contaminati, attraverso l'impiego di mezzi chimici (disinfettanti) o fisici (calore).

La decontaminazione è operazione da effettuarsi prima della detersione ed è obbligatoria nel caso in cui sia presente contaminazione biologica a rischio di trasmissione virale, con particolare attenzione per il sangue. Pertanto tutto il materiale riutilizzabile, venuto a contatto con liquidi potenzialmente infetti, prima di essere sottoposto alla procedura di detersione deve essere decontaminato. La decontaminazione deve essere effettuata subito dopo l'uso e/o la contaminazione, comunque nel più breve tempo possibile. È necessario sottolineare che la decontaminazione abbatte la carica microbica, ma non garantisce condizioni di sicurezza: per questo l'operatore nelle procedure successive dovrà attenersi ad adeguate misure di cautela.

Detersione

La detersione consiste nella rimozione e nell'allontanamento dello sporco e dei microrganismi in esso presenti, con conseguente riduzione della carica microbica. Il risultato dell'azione di detersione dipende da alcuni fattori: azione meccanica (es. sfregamento), azione chimica (detergente), temperatura e durata dell'intervento. La detersione è un intervento obbligatorio prima di disinfezione e sterilizzazione, perché lo sporco è ricco di microrganismi che vi si moltiplicano attivamente ed è in grado di ridurre l'attività dei disinfettanti.

Disinfezione

La disinfezione è un processo che ha l'obiettivo di uccidere i microrganismi patogeni o potenzialmente patogeni presenti su superfici ed oggetti, riducendo la carica microbica fino a livelli di sicurezza. Può essere attuata con mezzi chimici (disinfettanti) o fisici (calore).

Il termine "disinfettante" è più frequentemente usato per indicare quei prodotti che distruggono i germi nella fase di sviluppo, ad eccezione delle spore batteriche, particolarmente resistenti.

L'azione dei disinfettanti dipende da vari fattori:

1. livello di attività del prodotto;
2. concentrazione d'uso;
3. tempo di contatto;
4. grado di contaminazione iniziale del prodotto da trattare (carica microbica, presenza di materiale organico).

Alcuni disinfettanti (aldeide glutarica e acido peracetico), in condizioni d'uso particolari, possono agire anche sulle spore (effetto sporicida).

Envelope

Involucro della particella virale.

Fonte dei limiti

Provenienza dei Valori di riferimento.

HACCP

Hazard Analysis and Critical Control Points, ovvero analisi dei rischi e punti critici di controllo per prevenire la contaminazione degli alimenti.

Indice

Espressione sintetica delle dimensioni della contaminazione microbiologica.

Microrganismo indicatore

Indicatore biologico, bioindicatore, organismo o un sistema biologico usato per valutare una modificazione della qualità dell'ambiente.

Sterilizzazione

Processo fisico o chimico che ha come obiettivo la distruzione di tutte le forme di vita microbica, comprese le spore batteriche. In pratica il risultato che convenzionalmente si ritiene adeguato è l'abbattimento della carica microbica al di sotto della soglia di 10^{-6} . Ai sensi della norma UNI EN 556-1:2002 il livello di sicurezza di sterilità (*Sterility Assurance Level* o S.A.L.) deve corrispondere alla probabilità inferiore ad 1 su 1 milione di trovare un microrganismo sopravvivate all'interno di un lotto di sterilizzazione. Questo limite può essere garantito solo se, prima della sterilizzazione, la carica microbica iniziale (bioburden) è $\leq 10^2$. Per le caratteristiche di efficacia e sicurezza, la sterilizzazione è considerata intervento di prima scelta in presenza di situazioni a rischio infettivo elevato.

Valori di riferimento

Valori numerici (puntuali o intervallari) attraverso i quali è possibile interpretare e prendere una decisione in termini di accettabilità o meno delle condizioni esistenti negli ambienti di lavoro o di civili abitazioni in esame.



12. Bibliografia

Adams R.I., Miletto M., Taylor J.W., Bruns T.D., 2013. *The diversity and distribution of fungi on residential surfaces*. Plos One, (8)11: 1-11.

Amodio E., Cannova L., Villafrate M.R., Merendino A.M., Aprea L., Calamusa G., 2014. *Analytical performance issues: comparison of ATP bioluminescence and aerobic bacterial count for evaluating surface cleanliness in an Italian hospital*. J. Occ. Environ. Hyg., 11(2): D23-D27.

Amodio E., Dino C., 2014. *Use of ATP bioluminescence for assessing the cleanliness of hospital surfaces: A review of the published literature (1990-2012)*. J. Infect. Public Health, 7: 92-98.

Anderson R.E., Young V., Stewart M., Robertson C., Dancer S.J., 2011. *Cleanliness audit of clinical surfaces and equipment: who cleans what?* J. Hosp.Infect., 78: 178-181.

Ashour M.S. E.D., Mansy M.S., Eissa M.E., 2011. *Microbiological environmental monitoring in pharmaceutical facility*. Egypt. Acad. J. Biolog. Sci., 3(1): 63-74.

Assistance Publique Hopitaux de Paris, 2004. Guide de recommandation des bonnes pratiques - Tomo 2 parte 1, 2, 3.

Aycicek H., Oguz U., Karci K., 2006. *Comparison of results of ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing methods for the determination of surface cleanliness at a hospital kitchen*. Int. J. Hyg. Environ. Health, 209(2): 203-206.

Azizkhan Z.M., 2014. *Comparison between ATP bioluminescence technique and traditional microbiological method to detect contamination within food facilities in Saudi Arabia (Jiddah)*. Front. Public Health, 3(1): 11-18.

Bautista D.A., McIntyre I., Laleye L., Griffiths M.W., 1996. *The application of ATP bioluminescence for the assessment of milk quality and factory hygiene*. J. Rapid Meth. Auto. Microbiol., 1: 179-193.

Beaucaire G., Cattoen C., Levent T., 2001. *Prélèvements d'environnement dans les établissements de santé: Modes opératoires*. Areclin.

Bech-Andersen J. e Elborne S.A., 2003. *Moulds and indoor climate in Denmark*. Paper prepared for the 34th Annual Meeting, Brisbane, Australia. IRG Secretariat SE-100 44 Stockholm - Sweden

Carducci A., Verani M., Lombardi R., Casini B., Privitera G., 2011. *Environmental survey*

to assess viral contamination of air and surfaces in hospital settings. *J. Hosp.Infect.*, 77: 242-247.

Carducci A., Donzelli G., Cioni L., Verani M., 2016. *Quantitative microbial risk assessment in occupational settings applied to the airborne human adenovirus infection*. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 13: 733.

Carling P.C., Briggs J., Hylander D., Perkins J., 2006. An evaluation of patient area cleaning in 3 hospitals using a novel targeting methodology. *Am. J. Infect. Dis.* 42: 385-388.

Carling P.C., Bartley J.M., 2010. *Evaluating hygiene cleaning in health care settings: What you do not know can harm your patients*. *Am. J. Infect. Control*, 38(5 Suppl 1): 5.

Casey A.L. Karpanen T.J., Adams D., Lambert P.A., Nightingale P., Miruszenko L., Elliott T.S.J., 2011. *A comparative study to evaluate surface microbial contamination associated with copper-containing and stainless steel pens used by nurses in the critical care unit*. *Am. J. Infect. Control*, 39(8): e52-e54.

Castiglia P., Liguori G., Montagna M.T., Napoli C., Pasquarella C., Bergomi M., Fabiani L., Monarca S., Petti S. e SItI Working Group Hygiene in Dentistry, 2008. *Italian multi-center study on infection hazards during dental practice: Control of environmental microbial contamination in public dental surgeries*. *BMC Public Health*, 8: 187.

Catamo G., Di Bonaventura G., Lattanzio F.M., Lattanzio D., Piccolomini R., 1999. *Monitoraggio microbiologico di aria e superfici in ambiente di prime cure chirurgiche di ambulatorio Inail*. *Giornale Italiano di Microbiologia Medica Odontoiatrica e Clinica* Vol. III, 2: 128 - 134.

CCLIN Sud-Ouest, 2016. *Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé*. Guide de bonnes pratiques.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2002. *Outbreak of acute gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses among British military personnel—Afghanistan, May 2002*. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 51: 477-479.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2003. *Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)*, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2008a. *Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities*, - William A. Rutala, Ph.D., M.P.H.1,2, David J. Weber, M.D., M.P.H. 1,2, and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)3.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2008b. *Norovirus outbreak in an elementary school—District of Columbia, February 2007*. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 56: 1340-1343.

CDC (Centers for disease control and prevention), 2009. *Norovirus outbreaks on three college campuses—California, Michigan, and Wisconsin, 2008*. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep., 58: 1095-1100.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2012. *Emergency response resources: Surface sampling procedures for Bacillus anthracis spores from smooth, non-porous surfaces*. NIOSH Workplace Safety and Health Topic. Center for disease control and prevention

Ceresa L., 2006. *Microbiologia rapida*. NCF: 108-110.

Ceresa L., 2009. *ATP Bioluminescenza: benefici di un metodo di microbiologia*. Atti Congresso Tecnologie di determinazione rapida. Firenze.

Cetin O., Kahraman T., Buyukunal S.K., 2012. *Microbiological evaluation of food contact surfaces at red meat processing plants in Istanbul, Turkey*. Ital. J. Anim. Sci., 5: 277-283.

D.lgs. 9 aprile 2008, n. 81. *Attuazione dell'articolo 1 della Legge 3 agosto 2007, n. 123 in materia di tutela della salute e della sicurezza nei luoghi di lavoro*. Gazzetta Ufficiale n. 101 del 30 aprile 2008 - Suppl. Ordinario n. 108.

D.l. 31 gennaio 2007, n. 7 (in Gazzetta Ufficiale - serie generale - n. 26 del 1° febbraio 2007), coordinato con la legge di conversione 2 aprile 2007, n. 40 (in questo stesso S.O. alla pag. 5), recante «*Misure urgenti per la tutela dei consumatori, la promozione della concorrenza, lo sviluppo di attività economiche e la nascita di nuove imprese, la valorizzazione dell'istruzione tecnico-professionale e la rottamazione di autoveicoli*».

D.m. 7 luglio 1997, n. 274. *Regolamento di attuazione degli articoli 1 e 4 della legge 25 gennaio 1994, n. 82, per la disciplina delle attività di pulizia, di disinfezione, di disinfestazione, di derattizzazione e di sanificazione*.

Dacarro C., Grignani E., Lodola L., Grisoli P., Cottica D., 2000. *Proposta di indici microbiologici per la valutazione della qualità dell'aria degli edifici*. G. It. Med. Lav. Erg., 22(3): 229-235.

Dalmaso G., Bini M., Paroni R., Ferrari M., 2008. *Qualification of high recovery, flocked swabs as compared to traditional rayon swabs for microbiological environmental monitoring of surfaces*. PDA J. Pharm. Sci. Technol., 62: 191-199.

Dancer S.J., 2004. *How do we assess hospital cleaning? A proposal for microbiological standards for surface hygiene in hospitals*. J. Hosp. Infect., 56: 10-15.

Dancer S.J., 2009. *The role of environmental cleaning in the control of hospital-acquired infection*. J. Hosp. Infect., 73(4): 378-385.

Davidson C.A., Griffith C.J., Peters A.C., Fielding L.M., 1999. *Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness- ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing*. Luminescence, 14(1): 33-38.

Dey B.P. e Engley F.B., 1983. *Methodology for recovery of chemically treated Staphylococcus aureus with neutralizing medium*. Appl. Environ. Microbiol., 45: 1533-1537.

Dey B.P. e Engley F.B., 1995. *Comparison of Dey and Engley (D/E) neutralizing medium to Lethen medium and standard methods medium for recovery of Staphylococcus aureus from sanitized surfaces*. J. Ind. Microbiol., 14: 21-25.

Dolan A., Bartlett M., McEntee B., Creamer E., Humphreys H., 2011. *Evaluation of different methods to recover methicillin-resistant Staphylococcus aureus from hospital environmental surfaces*. J. Hosp. Infect., 79: 227-230.

Domenech-Sanchez A., Juan C., Perez J.L., Berrocal C.I., 2011. *Unmanageable norovirus outbreak in a single resort located in the Dominican Republic*. Clin. Microbiol. Infect., 17: 952-954.

Eckstein B.C., Adams D., Eckstein E., Rao A., Sethi A. K., Yadavalli G. K., Donskey C.J., 2007. *Reduction of Clostridium difficile and vancomycin-resistant Enterococcus contamination of environmental surfaces after an intervention to improve cleaning methods*. BMC Infect. Dis., 7: 61.

Ednie D.L., Wilson R.P., Lang C.M., 1998. *Comparison of Two Sanitation Monitoring Methods in an Animal Research Facility*. Contemp. Top., 37: 6.

Elsargany M., Moussa M., Ahsan A., Khalfan A., Eissa A., 2015. *Exploratory Study of Bacterial Contamination of Different Surfaces in Four Shopping Malls in Sharjah, UAE*. J. Environ. Occup. Sci., 4(2): 101-105.

European Collaborative Action, Indoor air quality and its impact on man, 1993. Report n. 12. *Biological particles in indoor environments*. Commission of the European Communities EUR 14988 EN.

European Commission. *EU Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use Revision to Annex 1. Manufacture of Sterile Medicinal Products*. Brussels, 2008. 25 November.

Faires M.C., Traverse M., Tater K.C., Pearl D.L., Weese J.S., 2010. *Methicillin-resistant and -susceptible Staphylococcus aureus infections in dogs*. Emerg. Infect. Dis., 16: 69-75.

Favero M.S., Bond W.W., 1991. *Chemical disinfection of medical and surgical materials*. In: Block SS, ed. *Disinfection, sterilization, and preservation*. Philadelphia: Lea & Febiger 617-641.

Flores G.E., Bates S.T., Caporaso J.G., Lauber C.L., Leff J.W., Knight R., Fierer N. Diversity, 2012. *Distribution and sources of bacteria in residential kitchens*. Environ. Microbiol. 10.1111/1462-2920.12036.

Gallimore C.I., Taylor C., Gennery A.R., Cant A.J., Galloway A., Xerry J., 2008. *Contamination of the Hospital Environment with Gastroenteric Viruses: Comparison of Two Pediatric Wards over a Winter Season*. J. Clin. Microbiol., 46: 3112-3115.

Galvin S., Dolan A., Cahill O., Daniels S., Humphreys H., 2012. *Microbial monitoring of the hospital environment: why and how?* J. Hosp. Infect., 82: 143-151.

Garayoa R., Díez-Leturia M., Bes-Rastrollo M., García-Jalón I., Vitas A.I., 2014. *Catering services and HACCP: Temperature assessment and surface.* Food Control, 43: 193-198.

Garcia-Graells C., Antoine J., Larsen J., Catry B., Skov R., Denis O., 2012 a. *Livestock veterinarians at high risk of acquiring methicillin-resistant Staphylococcus aureus ST398.* Epidemiol. Infect., 140: 383-389.

Garcia-Cruz C.P., Najera Aguilar M.J., Arroyo-Helguera O.E., 2012 b. *Fungal and bacterial contamination on indoor surfaces of a hospital in Mexico.* Jundishapur J. Microbiol., 5(3): 460-464.

Gerba C., Gramos D.M., Nwachuku N., 2002. *Comparative Inactivation of Enteroviruses and Adenovirus 2 by UV Light.* Appl. Environ. Microbiol., 68(10): 5167-5169.

Gharsa H., Ben Slama K., Lozano C., Gómez-Sanz E., Klibi N., Ben Sallem R., Gómez P., Zarazaga M., Boudabous A., Torres C., 2012. *Prevalence, antibiotic resistance, virulence traits and genetic lineages of Staphylococcus aureus in healthy sheep in Tunisia.* Vet Microbiol., 156(3-4): 367-373. doi: dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.11.009.

Griffith C.J., Cooper R.A., Gilmore J., Davies C., Lewis M., 2000. *An evaluation of hospital cleaning regimes and standards.* J. Hosp. Infect., 45: 19-28.

Griffith C.J., Davidson C.A., Peters A.C., Fielding L.M., 1997. *Toward a strategic cleaning assessment programme: hygiene monitoring and ATP luminometry, an options appraisal.* Food Sci. Technol. Today, 11: 15-24.

Groß R., Hübner N., Assadian O., Jibson B., Kramer A., 2010. Working Section for Clinical Antiseptic of the German Society for Hospital Hygiene. *Pilot study on the microbial contamination of conventional vs. silver-impregnated uniforms worn by ambulance personnel during one week of emergency medical service.* GMS Krankenhhyg Interdiszip., 5(2). pii: Doc09. doi: 10.3205/dgkh000152.

Gutarowska B., Skóra J., Stępień Ł., Szponar B., Otlewska A., Pielech-Przybylska K., 2015. *Assessment of microbial contamination within working environments of different types of composting plants.* J. Air Waste Manag. Assoc., 65(4): 466-478. doi: 10.1080/10962247.2014.960954.

Hanselman B.A., Kruth S.A., Rousseau J., Weese J.S., 2009. *Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets.* Can. Vet. J., 50: 954-958.

Hedin G., Rynback J., Lore B., 2010. *New technique to take samples from environmental surfaces using flocked nylon swabs.* Hosp Infect., 75(4): 314-7. doi: 10.1016/j.jhin.2010.02.027.

Hodges L.R., Rose L.J., Peterson A., Noble-Wang J., Arduino M.J., 2006. *Evaluation of a*

macrofoam swab protocol for the recovery of Bacillus anthracis spores from a steel surface. Appl. Environ. Microbiol., 72: 4429-4430.

Huang P.Y., Shi Z.Y., Chen C.H., Den E., Huang H.M., Tsai J.J., 2013. *Airborne and surface-bound microbial contamination in two Intensive care units of a medical center in Central Taiwan.* Aerosol Air Qual. Res., 13: 1060-1069.

Hurst C., Gerba C., Cech I., 1980. *Effects of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil.* Appl. Environ. Microbiol., Dec;40(6):1067-79.

Inail, Consulenza Tecnica Accertamento Rischi e Prevenzione. *Il monitoraggio microbiologico negli ambienti di lavoro. Campionamento e analisi*, Edizioni Inail 2005 e 2010.

Inail, Consulenza Tecnica Accertamento Rischi e Prevenzione. *La qualità del dato analitico nel monitoraggio ambientale del bioaerosol. L'esperienza INAIL di intercalibrazione dei conteggi microbici su piastra*, Edizioni INAIL 2011.

Isakbaeva E.T., Widdowson M., Beard R.S., Bulens S.N., Mullins J., Monroe S.S., Bresee J., Sassano P., Cramer E.H., Glass R.I., 2005. *Norovirus transmission on cruise ship.* Emerg. Infect. Dis., 11:154 -158.

ISO 11290-1, *Microbiologia di alimenti e mangimi per animali. Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di Listeria monocytogenes. Parte 1: Metodo per la ricerca*, 1996.

ISO 14644-1, *Cleanrooms and associated controlled environments — Part 1: Classification of air cleanliness by particle concentration*, 2015. http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_tc_browse.htm?commid=54874

ISO 14644-2, *Cleanrooms and associated controlled environments — Part 2: Monitoring to provide evidence of cleanroom performance related to air cleanliness by particle concentration*, 2015

ISO 14698-1, *Cleanrooms and associated controlled environments — Biocontamination control — Part 1: General principles and methods* , 2003

ISO 14698-2, *Cleanrooms and associated controlled environments — Biocontamination control — Part 2: Evaluation and interpretation of biocontamination data*, 2003.

ISO 18593, *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs*, 2004.

ISO/DIS 14644-4, *Cleanrooms and Associated Controlled Environments. Part 4: Design and Construction*, 1998.

Ispesl, Dipartimento Igiene del Lavoro. *Linee guida sugli standard di sicurezza e di igiene del lavoro nel reparto operatorio*, dicembre 2009.

Istituto Superiore della Sanità, 2013. *Linee guida per l'analisi microbiologica dei prodotti cosmetici*, VII 94 p. Rapporti Istan 13/15.

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, 2015. *Linee guida per il campionamento di superfici per analisi microbiologica*. rev. 2:1-7. <http://www.izsvenezie.it/>
- Jones E.L., Kramer A., Gaither M., Gerba C.P., 2007. *Role of fomite contamination during an outbreak of norovirus on houseboats*. Int. J. Environ. Health Res., 17: 123-131.
- Julian T.R., Tamayo F.J., Leckie J.O., Boehm A.B., 2011. Comparison of surface sampling methods for virus recovery from fomites, Appl. Environ. Microbiol., 77, 6918 -25.
- Kac G., Podglajen I., Vaupre S., Colardelle N., Buu-Hof A., Gutmann L., 2004. *Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae isolated from environmental and clinical specimens in a cardiac surgery intensive care unit*. Infect. Control Hosp. Epidemiol., 25: 852-855.
- Kearns K.A., Witmer D., Makda J., Parvizi J., Jungkind D., 2011. *Sterility of the Personal Protection System in Total Joint Arthroplasty*. Clin. Orthop. Relat. Res., 469: 3065-3069
- Konecka-Martyjek E., Mackiw E., Krygier B., Tomczuk K., Stos K., Jarosz M., 2012. *National monitoring study on microbial contamination of food-contact surfaces in hospital kitchen in Poland*. Ann Agric Environ Med., 19 (3): 457:463.
- Kyriakides A.L., Costello S.M., Doyle G., Easter M.C., Johson I., 2010. Rapid hygiene monitoring using ATP bioluminescence in. Stanley PE, Kricka LJ editors. Bioluminescence and chemiluminescence: current status. Chichester, Wiley 1991:519-22. Krankenhaushyg Interdiszip. 5(2): Doc09. DOI: 10.3205/dgkh000152, URN: urn:nbn:de:0183-dgkh0001527
- Landers T.F., Hoet A., Wittum T.E., 2010. *Swab type, moistening, and preenrichment for Staphylococcus aureus on environmental surfaces*. J. Clin. Microbiol., 48: 2235-2236.
- Legge 25 gennaio 1994, n. 82, *Disciplina delle attività di pulizia, di disinfezione, di disinfestazione, di derattizzazione e di sanificazione*. In Gazz. Uff., 3 febbraio 1994, n. 27.
- Lejeune B., 2004. *La contamination des surfaces de l'environnement hospitalier*. Congres SFHH Montpellier 2004.
- Lemmen SW., Häfner H., Zolldann D., Amedick G., Lütticken R., 2001. *Comparison of two sampling methods for the detection of Gram-positive and Gram-negative bacteria in the environment: moistened swabs versus Rodac plates*. Int J Hyg Environ Health, 203(3): 245-248.
- Leparc I., Aymard M., Fuchs F., 1994. Acute, chronic and persistent enterovirus and poliovirus: detection of viral genome by seminested PCR amplification in culture-negative samples. Mol. Cell. Probes., 8(6):487-95.
- Lewandowski R., Kozłowska K., Szpakowka M., Stepinska M., Trafny E.A., 2010. *Use of Foam spatula for sampling surfaces after bioaerosol deposition*. Appl. Environ. Microbiol., 10(3): 688-694.

Luksamijarulkul e Pipitsangjan, 2015. *Microbial air quality and bacterial surface contamination in ambulances during patient services*. Oman Med. J., 30(2): 104-110.

Magin C.M., May R.M., Drinker M.C., Cuevas K.H., Brennan A.B., Reddy S.T., 2015. *Micropatterned protective membranes inhibit lens epithelial cell migration in posterior capsule opacification model*. TEST, (4), 2: 1-8.

Malik R.E., Cooper R.A., Griffith C.J. 2003. *Use of audit tools to evaluate the efficacy of cleaning systems in hospitals*. Am. J. Infect. Control, 31:181-187.

Marriott N.G. e Gravani R.B., 2009. *Sanificazione nell'industria alimentare*. Ed Springer.

Martirosian G., 2006. *Recovery of Clostridium difficile from hospital environments*. J. Clin. Microbiol., 44: 1202-1203.

Maujean G., Malicier D., Fanton L., 2012. *Air, Water, and Surface Bacterial Contamination in a University-Hospital Autopsy Room*. J. Forensic Sci., 57(2).

Mayet A., Andreo V., Bedubourg G., Victorion S., Plantec J., Soullie B., Meynard J., Dedieu J., Polveche P., Migliani R., 2011. *Food-borne outbreak of norovirus infection in a French military parachuting unit*. Euro Surveill., 16(30): <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19930>

McCarthy M., Estes M.K., Hyams K.C., 2000. *Norwalk-like virus infection in military forces: epidemic potential, sporadic disease, and the future direction of prevention and control efforts*. J. Infect. Dis., 181(Suppl 2): S387-S391. <http://dx.doi.org/10.1086/315582>.

Mulvey D., Redding P., Robertson C., Woodall C., Kingsmore P., Bedwell D., Dancer S.J., 2011. *Finding a benchmark for monitoring hospital cleanliness*. J. Hosp. Infect., 77: 25-30.

Nadal M., Inza I., Schuhmacher M., Figueras M.J., Domingo J.L., 2009. *Health risks of the occupational exposure to microbiological and chemical pollutants in a municipal waste organic fraction treatment plant*. Int. J. Hyg. Environ. Health, 212(6): 661-9. doi: 10.1016/j.ijheh.2009.06.002.

Obee P., Griffith C.J., Cooper R.A., Bennion N.E., 2007. *An evaluation of different methods for the recovery of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from environmental surfaces*. J. Hosp. Infect., 65: 3.

Osimani A., Garofalo C., Clementi F., Tavoletti S., Aquilanti L., 2014. *Bioluminescence ATP monitoring for the routine assessment of food contact surface cleanliness in a university canteen*. Int. J. Environ. Res. Public Health, 11: 10824-10837.

Otter J.A., Yezli S., Salkeld J.A., French G.L., 2013. *Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings*. Am. J. Infect. Control, 41(5 Suppl): S6-11.

Pasquarella C., Veronesi L., Napoli C., Castiglia P., Liguori G., Rizzetto R., Torre I., Righi

E., Farruggia P., Tesauro M., Torregrossa M. V., Montagna M.T., Colucci M.E., Gallè F., Masia M.D., Strohmenger L., Bergomi M., Tinteri C., Panico M., Pennino F., Cannova L., Tanzi M., SItI Working Group Hygiene in Dentistry, 2012. *Microbial environmental contamination in Italian dental clinics: A multicenter study yielding recommendations for standardized sampling methods and threshold values*. Sci. Total Environ., 420: 289-299.

Persoons R., Parat S., Stoklov M., Perdrix A., Maitre A., 2010. *Critical working tasks and determinants of exposure to bioaerosols and MVOC at composting facilities*. Int. J. Hyg. Environ. Health, Sep; 213(5): 338-47. doi: 10.1016/j.ijheh.2010.06.001.

Petinaki E., Spiliopoulou I., 2012. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus among companion and food-chain animals: impact of human contacts*. Clin. Microbiol. Infect., 18: 626-634.

Pfirschmann A., van den Bossche G., 1994. *Occurrence and isolation of human enteroviruses from the air of waste removal and disposal plants*. Zentralbl. Hyg. Umweltmed., 196(1): 38-51.

Piazza M., Guadagnino V., Picciotto L., Borgia G., Nappa S., 1987. *Contamination by hepatitis B surface antigen in dental surgeries*. BMJ 295: 473-474.

Poulis J.A., de Pijper M., Mossel DA., Dekkers P.P., 1993. *Assessment of cleaning and disinfection in the food industry with the rapid ATP-bioluminescence technique combined with the tissue fluid contamination test and a conventional microbiological method*. Int. J. Food Microbiol., 20(2): 109-116.

Quddoumi S.S., Bdour S.M., Mahasneh A.M., 2006. *Isolation and characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from livestock and poultry meat*. Ann. Microbiol., 56: 155-161.

Regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. G.U.C.E. L338/1 del 22.12.2005.

Reynolds K.A., Watt P.M., Boone S.A., Gerba C.P., 2005. *Occurrence of bacteria and biochemical markers on public surfaces*. Int. J. Environ. Health Res., 15 : 225-34.

Ripamonti B., Marossi L., Cantoni C., Colombo F., Manteca B., Stella S., 2002. *Confronto fra i metodi di prelievo mediante tampone e mediante sponge bag nella valutazione dello stato igienico delle superfici di lavorazione nel settore delle carni*. Ingegneria Alimentare 1: 19-24.

Rodríguez-Lázaro D., Cook N., Ruggeri F.M., Sellwood J., Nasser A., Nascimento M.S., D'Agostino M., Santos R., Saiz J.C., Rzeżutka A., Bosch A., Gironés R., Carducci A., Muscillo M., Kovač K., Diez-Valcarce M., Vantarakis A., von Bonsdorff C.H., de Roda Husman A.M., Hernández M., van der Poel W.H., 2012. *Virus hazards from food, water and other contaminated environments*. FEMS Microbiol. Rev., 36(4): 786-814. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00306.x. Epub 2011 Oct 24. Review.

- Rose L., Jensen B., Peterson A., Banerjee S.N., Srdino M.J., 2004. *Swab materials and Bacillus anthracis spore recovery from nonporous surfaces*. Emerg. Infect. Dis., 10:1023-1029.
- Rose L.J., Hodges L., O'Connell H., Noble-Wang J., 2011. *National Validation Study of a Cellulose Sponge Wipe-Processing Method for Use after Sampling Bacillus anthracis Spores from Surfaces*. Appl. Environ. Microbiol., 77(23): 8355-8359.
- Rutala W.A., 1990. *Apic guideline for selection and use of disinfectants*. Am. J. Infect. Control, 18: 99-117.
- Rutala W.A., Weber D.J. and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008*. http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/guidelines/disinfection_nov_2008.pdf
- Saegeman V., Flamaing J., Muller J., Peetermans W.E., Stuyck J., Verhaegen J., 2011. *Clinical evaluation of the Copan ESwab for methicillin-resistant Staphylococcus aureus detection and culture of wounds*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 30: 943-949.
- Shaughnessy R.J., Cole E.C., Moschandreas D., Haverinen-Shaughnessy U., 2013. *Atp as a Marker for Surface Contamination of Biological Origin in Schools and as a Potential Approach to the Measurement of Cleaning Effectiveness*. J. Occup. Environ. Hyg., 10: 336-346. DOI: 10.1080/15459624.2013.784633
- Sherlock O., O'Connell N., Creamer E., Humphreys H., 2009. *Is it really clean? An evaluation of the efficacy of four methods for determining hospital cleanliness*. J. Hosp. Infect., 72: 140-146.
- Silverman G.J., Ross E.W., Kautz W.P., 1981. *Assessment of the sanitary quality of food preparation surface*. Journal of Foodservice System, 4: 285-301.
- Souliotis A., Palisidis G., Giazitzi K., Boskou G., 2015. *Benchmarking the hygiene of utensils in butcheries or retail stores*. SAJ Nutri. Food, 1: 101.
- Spaulding E.H., 1968. *Chemical disinfection of medical and surgical materials*. In: Lawrence C, Block SS, eds. *Disinfection, sterilization, and preservation*. Philadelphia: Lea & Febiger 517-531.
- UNI 11527, *Beni culturali - Rilevamento della carica microbica dell'aria in ambienti interni - Metodo di campionamento passivo mediante piastre di sedimentazione*, 2014.
- UNI EN ISO 14698-1, *Camere bianche ed ambienti associati controllati - Controllo della contaminazione - Parte 1: Principi generali e metodi*, 2004.
- UNI EN ISO 14698-2, *Camere bianche ed ambienti associati controllati - Controllo della contaminazione - Parte 2: Valutazione e interpretazione dei dati di biocontaminazione*, 2004.
- Voss A., Loeffen F., Bakker J., Klaassen C., Wulf M., 2005. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pig farming*. Emerg. Infect., 11: 1965-1966.

Weber D.J., Rutala W.A., Miller MB, Sickbert-Bennett E, 2010. *Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care associated pathogens: Norovirus, Clostridium difficile, and Acinetobacter species*. Am. J. Infect. Control., 38: S25-33.

Wesche A.M., Gurtler J.B., Marks B.P., Ryser E.T., 2009. *Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens*. J. Food Prot., 72: 1121-1138.

WHO. *Guidelines on Hand Hygiene in Health Care* - 2009.

Wu H.M., Fornek M., Schwab K.J., Chapin A.R., Gibson K., Schwab E., Spencer C., Henning K., Weber H.M., 2005. *A norovirus outbreak at a long-term-care facility: the role of environmental surface contamination*. Infect. Control Hosp. Epidemiol., 26: 802-810.

Bibliografia relativa al Capitolo 5

Abad, F., Pintó, R., & Bosch, A. (1994). *Survival of enteric viruses on environmental fomites*. Applied and Environmental Microbiology, 60(10):3704-3710.

Ansari S.A., Sattar S.A., Springthorpe V.S., Wells G.A., Tostowaryk W., 1988. *Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to animate and nonporous inanimate surfaces*. J Clin Microbiol., 26(8):1513-1518.

Ansari, S., Springthorpe, V., Sattar, S., Rivard, S., & Rahman, M. (1991). *Potential role of hands in the spread of respiratory viral infections: studies with human parainfluenza virus 3 and rhinovirus 14*. Journal of Clinical Microbiology, 29(10):2115-9.

Barker, J., Vipond, I., & Bloomfield, S. (2004). *Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of Norovirus contamination via environmental surfaces*. Journal of Hospital Infections, Sep;58(1):42-9.

Boone, S., & Gerba, C. (2007). *Significance of Fomites in the Spread of Respiratory and Enteric Viral Disease*. Applied and Environmental Microbiology, p. 1687-1696, Vol. 73, No. 6.

Bosch A, Sánchez G, Abbaszadegan M, Carducci A, Guix S, Le Guyader Fs, Netshikweta R, Pintó Rm, Van Der Poel W, Rutjes S, Sano D, Taylor Mb, Van Zyl Wb, Rodríguez-Lázaro D, Kovac K, Sellwood J. (2010). *Analytical Methods for Virus Detection in Water and Food*. Food Anal. Methods. DOI 10.1007/s12161-010-9161-5.

Boxman I L A , Dijkman R , Te Loeke N A J M , H Ä Gele G , Tilburg J J H C , Vennema H , Koopmans M (2009). *Environmental swabs as a tool in norovirus outbreak investigation, including outbreaks on cruise ships*. J Food Prot , 72 , 111 -19.

Boxman, I., Dijkman, R., Verhoef, L., Maat, A., Van Dijk, G., Vennema, H., et al. (2009). *Norovirus on swabs taken from hands illustrate route of transmission: a case study*. Journal of Food Protection, 72(8):1753-5.

Carducci A, Verani M, Lombardi R, Casini B, Privitera G (2011). *Environmental survey to*

assess viral contamination of air and surfaces in hospital settings. J Hosp Infect. 77(3):242-7.

Carducci A., Arrighi S., Ruschi A. (1995). *Detection of coliphages and enteroviruses in sewage and aerosol from an activated sludge wastewater treatment plant.* Lett Appl Microbiol. Sep;21(3):207-9.

Carducci A., Battistini R., Rovini E., Verani M. (2009). *Viral removal by wastewater treatment: monitoring of indicators and pathogens.* Food and Environmental Virology, 1:85-91.

Carducci A., Cantiani L., Moscatelli R., Casini B., Rovini E., Mazzoni F., Giuntini A., Verani M. (2002) *Interference between enterovirus and reovirus as a limiting factor in environmental virus detection.* Lett Appl Microbiol. 34:110-113.

Carducci A., Donzelli G., Cioni L., Verani M. (2016) *Quantitative microbial risk assessment in occupational settings applied to the airborne human adenovirus infection.* Int. J. Environ. Res. Public Health 2016, 13, 733; doi:10.3390/ijerph13070733.

Carducci A., Tozzi E., Rubulotta E., et al. (2000). *Assessing airborne biological hazard from urban wastewater treatment.* Water Research, 34 (4): 1173-78.

Carducci A., Verani M., Casini B., Giuntini A., Mazzoni F., Rovini E., Passaglia A., Giusti L., Valenza A., Lombardi R. (2002). *Detection and potential indicators of the presence of hepatitis C virus on surfaces in hospital settings.* Lett. In Appl. Microbiol. 34: 189-193.

Casini B., Mazzoni F., Giuntini A., Martini E., Verani M., Rovini E., Pacini R., Carducci A. (2001). *Formazione di aerosol microbico nel processo di aerazione a turbina dei fanghi attivi.* Atti I° Conv. Naz.le "Rischio biologico aerodisperso nelle aree degli impianti di depurazione: stato dell'arte e misure di tutela" - Rivista Italiana di Igiene, 61 (1-2): 81-87.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2008. *Norovirus outbreak in an elementary school—District of Columbia, February 2007.* MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep., 56: 1340-1343.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2009. *Norovirus outbreaks on three college campuses—California, Michigan, and Wisconsin, 2008.* MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep., 58: 1095-1100.

Clark C.S. (1981). *Health risks of human exposure to wastewater.* EPA-600/1-81-069, US. EPA, Cincinnati, Ohio.

Cliver. (2009). *Control of Viral Contamination of Food and Environment.* Food Environ. Virol., 3-9.

Couch, R., Cate, T., Douglas, R., Gerone, P., & Knight, V. (1966). *Effect of route of inoculation on experimental respiratory viral disease in volunteers and evidence for airborne transmission.* Bacteriol. Rev., 30(3):517-29.

Domenech-Sanchez A., Juan C., Perez J.L., Berrocal C.I., (2011). *Unmanageable norovirus outbreak in a single resort located in the Dominican Republic*. Clin. Microbiol. Infect., 17: 952-954.

D'Souza DH, Williams K, Jean J, Sair A, Jaykus L (2003). *Persistence of Norwalk virus on environmental surfaces and its transfer to food*; Washington, D.C., American Society for Microbiology.

Duizer, E., Bijkerk, P., Rockx, B., Groot, A. d., Twisk, F., & Koopmans, M. (2004). *Inactivation of Caliciviruses*. Appl. Environ. Microbiol., 70(8):4538-4543.

Gallimore C I, Taylor C, Gennery A R, Cant A J, Galloway A , Xerry J , Adigwe J, Gray J J (2006). *Environmental monitoring for gastroenteric viruses in a paediatric primary immunodeficiency unit*. J. Clin. Microbiol., 44 , 395 -9.

Gallimore CI, Taylor C, Gennery AR, Cant AJ, Galloway A, Xerry J, (2008). *Contamination of the Hospital Environment with Gastroenteric Viruses: Comparison of Two Pediatric Wards over a Winter Season*. Journal of Clinical Microbiology 46: 3112-3115.

Ganime AC, Carvalho-Costa FA, Mendonça MCL, Vieira CB, Santos M, Costa Filho R (2012). *Group A rotavirus detection on environmental surfaces in a hospital intensive care unit*. Am. J. of Infect. Control; 40: 544-5477.

Gerba, C., Gramos, D. M., & Nwachuku, N. (2002). *Comparative Inactivation of Enteroviruses and Adenovirus 2 by UV Light*. Appl. Environ. Microbiol., 68(10): 5167-5169.

Gwaltney, J. J., Moskalski, P., & Hendley, J. (1978). *Hand-to-hand transmission of rhinovirus colds*. Ann. Inter. Med., 88(4):463-7.

Isakbaeva E.T., Widdowson M., Beard R.S., Bulens S.N., Mullins J., Monroe S.S., Bresee J., Sassano P., Cramer E.H., Glass R.I., 2005. *Norovirus transmission on cruise ship*. Emerg. Infect. Dis., 11:154 -158.

Julian T R , Tamayo F J , Leckie J O, Boehm A B (2011). *Comparison of surface sampling methods for virus recovery from fomites*, Appl. Environ. Microbiol., 77, 6918 -25.

Keswick, B., Pickering, L., DuPont, H., & Woodward, W. (1983). *Survival and detection of rotaviruses on environmental surfaces in day care centers*. Applied and Environmental Microbiology, Oct;46(4):813-6.

Kramer A, Schwebke I, Kampf G (2006). *How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review*. BMC Infect Dis. 2006 Aug 16;6:130.

Mayet A., Andreo V., Bedubourg G., Victorion S., Plantec J., Soullie B., Meynard J., Dedieu J., Polveche P., Migliani R., (2011). *Food-borne outbreak of norovirus infection in a French military parachuting unit*. Euro Surveill., 16(30): <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19930>.

Mocé-Llivina, L., Papageorgiou, G., & Jofre, J. (2006). *A membrane-based quantitative*

carrier test to assess the virucidal activity of disinfectants and persistence of viruses on porous fomites. J. Virol, Methods, Jul;135(1):49-5.

Okabayashi, T., Yokota, S., Ohkoshi, Y., Ohuchi, H., Yoshida, Y., Kikuchi, M., et al. (2008). *Occurrence of norovirus infections unrelated to norovirus outbreaks in an asymptomatic food handler population.* J. Clin. Microbiol., 46(6):1985-8.

Okoh AI, Sibanda T, Gusha SS (2010). *Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment.* Int. J. Environ. Res Public Health 7(6):2620-37.

Pfirrmann A., vanden Bossche G. (1994). *Occurrence and isolation of human enteroviruses from the air of waste removal and disposal plants.* Zentralbl. Hyg. Umweltmed. Aug;196(1):38-51.

Piazza M., Guadagnino V., Picciotto L., Borgia G., Nappa S. (1987). *Contamination by hepatitis B surface antigen in dental surgeries.* Brit. Med. J., 295: 473-474.

Rheinbaben, F., Schünemann, S., Gross, T., & Wolff, M. (2000). *Transmission of viruses via contact in a household setting: experiments using bacteriophage straight phiX174 as a model virus.* J. Hosp. Infect., Sep;46(1):61-6.

Rodríguez-Lázaro D., Cook N., Ruggeri F.M., Sellwood J., Nasser A., Nascimento M.S., D'Agostino M., Santos R., Saiz J.C., Rzežutka A., Bosch A., Gironés R., Carducci A., Muscillo M., Kovač K., Diez-Valcarce M., Vantarakis A., von Bonsdorff C.H., de Roda Husman A.M., Hernández M., van der Poel W.H., (2012). *Virus hazards from food, water and other contaminated environments.* FEMS Microbiol. Rev., 36(4): 786-814. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00306.x. Epub 2011 Oct 24. Review.

Sattar, S., Lloyd-Evans, N., Springthorpe, V., & Nair, R. (1986). *Institutional outbreaks of rotavirus diarrhoea: potential role of fomites and environmental surfaces as vehicles for virus transmission.* The Journal of Hygiene, 96(2):277-89.

Scherer K, Made D, Ellerbroek L, Schulenburg J, Johne R, Klein G (2009). *Application of a swab sampling method for the detection of norovirus and rotavirus on artificially contaminated food and environmental surfaces,* Food Environ. Virol., 1, 42 -9.

Simonet, J., & Gantzer, C. (2006). *Inactivation of poliovirus 1 and F-specific RNA phages and degradation of their genomes by UV irradiation at 254 nanometers.* Appl. Environ. Microbiol., 72(12):7671-7.

Soule H, Genoulaz O, Gratacap-Cavallier B, Mallaret MR, Morand P, François P, Luu Duc Bin D, Charvier A, Bost-Bru C, Seigneurin JM. (1999). *Monitoring rotavirus environmental contamination in a pediatric unit using polymerase chain reaction.* Infect. Control Hosp. Epidemiol. 20(6):432-4.

Vasickova, P., Pavlik, I., Verani, M., & Carducci, A. (2010). *Issues Concerning Survival of Viruses on Surfaces.* Food Environ. Virol., 2:24-34.

Verani M, Bigazzi R, Carducci A. (2014) *Viral contamination of aerosol and surfaces through toilet use in healthcare and other settings*. Am. J. Infect. Control., 42(7):758-62.

Weber D.J., Rutala W.A., Miller MB, Sickbert-Bennett E, 2010. *Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care associated pathogens: Norovirus, Clostridium difficile, and Acinetobacter species*. Am. J. Infect. Control., 38: S25-33.

Wong K.C., Leung K.S. (2004). *Transmission and prevention of occupational infections in orthopaedic surgeons*. J. Bone Joint Surg. Am. 86-A(5):1065-76.

Wu H M , Fornek M , Schwab K J , Chapin A R , Gibson K , Schwab E , Spencer C, Henning K (2005). *A norovirus outbreak at a long-term-care facility: the role of environmental surface contamination*. Infect. Control. Hosp. Epidemiol., 26, 802 -10.

Wyn-Jones AP, Carducci A, Cook N, D'Agostino M, Divizia M, Fleischer J, Gantzer C, Gawler A, Girones R, Höller C, de Roda Husman AM, Kay D, Kozyra I, López-Pila J, Muscillo M, Nascimento MS, Papageorgiou G, Rutjes S, Sellwood J, Szewzyk R, Wyer M. (2011). *Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters*. Water Res. 45(3):1025-38.

Yeargin T, Buckley D, Fraser A, Jiang X (2016). *The survival and inactivation of enteric viruses on soft surfaces: A systematic review of the literature*. Am. J. Infect. Control. doi: 10.1016/j.ajic.2016.03.018.









