

PROCEDURA SPERIMENTALE PER LA DETERMINAZIONE DI SPORE FUNGINE IN ATMOSFERA

INAIL

2016

Pubblicazione realizzata da

Inail

Dipartimento innovazioni tecnologiche
e sicurezza degli impianti, prodotti e insediamenti antropici

Autori

Patrizia Di Filippo
Carmela Riccardi
Donatella Pomata

Collaborazioni

Francesca Buiarelli, Dipartimento di Chimica dell'Università Sapienza di Roma

per informazioni

Inail - Dipartimento innovazioni tecnologiche
e sicurezza degli impianti, prodotti e insediamenti antropici
via Roberto Ferruzzi, 38/40 - 00143 Roma
dit@inail.it
www.inail.it

© 2016 Inail
isbn 978-88-7484-521-7

Gli autori hanno la piena responsabilità delle opinioni espresse nelle pubblicazioni, 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.

Presentazione

Il rischio biologico all'interno dei luoghi di lavoro o in luoghi pubblici con grande affluenza di persone non sempre è ben conosciuto e, di conseguenza, correttamente prevenuto.

Il d.lgs. 81/08 classifica come agente biologico *“qualsiasi microorganismo, anche se geneticamente modificato, coltura cellulare ed endoparassita umano che potrebbe provocare infezioni, allergie o intossicazioni”*. Batteri, virus, funghi ricadono tutti all'interno di questa descrizione e sono elencati nell'allegato XLVI classificandoli in tre gruppi (2, 3 e 4) sulla base dell'effetto esercitato su lavoratori sani.

Parte dell'esposizione umana ad agenti biologici è dovuta ai microorganismi trasportati dall'aria che nel loro insieme costituiscono una porzione del bioaerosol. Alcuni esempi di luoghi di lavoro, con atmosfere potenzialmente inquinate da bioaerosol, sono i laboratori di ricerca biotecnologica, le aziende farmaceutiche, le aziende agro-alimentari e quelle di allevamento del bestiame, o quelle che lavorano nel campo del trattamento dei rifiuti, ma anche tutti i luoghi di lavoro o di vita che possono subire contaminazioni indirette.

Le norme UNI EN ISO 14698-1:2004, UNI EN ISO 14698-2:2004, UNI 11108:2004, UNI EN 13098:2002, UNI CEN/TS 16115-1:2011, UNI EN 14031:2005 riportano i principi generali e i metodi per il controllo della biocontaminazione e la valutazione e interpretazione dei dati.

Tali metodi richiedono la conta al microscopio, che presenta errori dovuti all'accuratezza del conteggio stesso e all'incertezza dell'identificazione. Inoltre, nel caso di misure di microorganismi vitali, la coltivazione, dopo campionamento, causa tempi lunghi di analisi e errori dovuti ad anomalie di crescita.

Al contrario, l'utilizzo di indicatori della presenza generica di microorganismi ridurrebbe i costi e velocizzerebbe l'informazione, vantaggi che sarebbero superiori allo svantaggio di non individuare tra le specie presenti quelle vitali e/o particolarmente dannose.

Il presente lavoro propone pertanto l'analisi di ergosterolo nel bioaerosol come indicatore della presenza di spore fungine in atmosfera.

Carlo De Petris

*Direttore del Dipartimento innovazioni tecnologiche
e sicurezza degli impianti, prodotti e insediamenti antropici*

Sommario

Premessa	7
1. Il bioaerosol e gli ambienti di lavoro	9
1.1. Funghi e spore fungine	10
2. Ricerca della componente fungina del bioaerosol	12
2.1. Metodo analitico per la determinazione della componente fungina aerodispersa	12
2.1.1. Estrazione	12
2.1.2. Purificazione	13
2.1.3. Derivatizzazione	13
2.1.4. Analisi in Gas Cromatografia associata a Spettrometria di Massa	13
2.2. Analisi quantitativa	13
2.2.1. Rette di calibrazione in soluzione e qualità del dato	13
2.2.2. Rette di calibrazione in matrice e qualità del dato	14
2.3. Fattori di conversione per convertire il biomarker in massa fungina	15
2.4. Quantità di spore fungine trovate in un'atmosfera suburbana/ rurale	16
2.4.1. Campionamento	16
2.4.2. Analisi	17
3. Conclusioni	18
Bibliografia	19
RIFERIMENTI LEGISLATIVI	22

Premessa

Le spore fungine, insieme ad altre particelle di origine biologica (il bioaerosol), possono rappresentare grandi porzioni del materiale particolato dell'aria. L'esposizione a lungo termine a spore fungine, che rappresentano la struttura fondamentale della riproduzione e della diffusione dei funghi, è correlata a sintomi respiratori ed a sintomi da sindrome tossica da polvere organica.

Negli ambienti professionali in cui sono gestiti rifiuti, rifiuti organici, o compost, i conteggi di spore fungine sono da due a quattro ordini di grandezza superiori che in ambienti domestici. Ciò può indurre ad un alto rischio per i lavoratori di acquisire malattie allergiche respiratorie o sensibilizzazione ai diversi funghi. Vari casi di alveoliti allergiche dovute ad una massiccia esposizione fungina sono stati inoltre descritti per una serie di professioni nei settori agricolo, forestale, e della produzione alimentare e farmaceutica.

Sebbene la validazione dei metodi di misurazione dei microrganismi sia limitata dalla mancanza di materiali di riferimento e/o metodi di riferimento, diverse norme tecniche UNI (UNI EN ISO 14698-1:2004, UNI EN ISO 14698-2:2004, UNI EN 13098:2002, UNI CEN/TS 16115-1:2011, UNI EN 14031:2005) riportano i principi generali e i metodi per il controllo della biocontaminazione e la valutazione e interpretazione dei dati nell'aria ambiente e nei luoghi di lavoro.

Tra queste, la norma UNI CEN/TS 16115-1:2011 (recepimento della specifica tecnica europea) e la UNI 11108:2004 si riferiscono specificatamente alla determinazione di muffe e ai metodi di campionamento e conteggio delle spore fungine aerodisperse.

In particolare, il metodo standard per l'analisi di muffe in aria ambiente riportato nella specifica tecnica UNI CEN/TS 16115-1:2011, è accettato per convenzione come metodo di riferimento. Il metodo descritto è in grado di misurare solo microrganismi coltivabili in quanto, per l'analisi microbiologica, è previsto si debbano determinare le Unità Formanti Colonie (UFC), vale a dire il numero di colonie microbiche che si formano a partire da singole cellule vitali (*viable*), su terreni agarizzati.

Eppure, mentre le infezioni possono essere causate solo da cellule fungine vitali, è dimostrato che la componente fungina non ha bisogno di essere *viable* per suscitare una reazione allergica.

La Norma UNI 11108:2004, (norma nazionale elaborata dalla Commissione

Ambiente) prevede invece un procedimento per la conta di tutte le spore campionate, indipendentemente dalla loro vitalità. Quest'ultima norma non prevede un campionamento che effettui taglio granulometrico delle particelle, ma il collezionamento della frazione toracica delle particelle (PM₁₀, particelle con diametro aerodinamico uguale o inferiore a 10 µm) sia delle frazioni di bioaerosol di dimensioni maggiori, ma che possono causare irritazione per contatto ad esempio con le mucose. Nella Norma viene sottolineato che il risultato della concentrazione delle spore così campionate è dipendente però da una serie di importanti fattori, quali: l'incertezza nell'identificazione delle spore e anche la capacità dell'operatore di riconoscerle correttamente; la concentrazione atmosferica delle spore (che non deve essere superiore a 10⁴ per metro cubo); la scelta di come conteggiare (percentuale di superficie campionata e numero di campi di lettura che si sceglie di sottoporre a conta).

Più in generale, la norma UNI EN 13098:2002 prevede il campionamento e la conta sia delle particelle *viable* che non *viable* del bioaerosol, comprese le spore fungine. Anche in questa norma si sottolinea che l'accuratezza dell'analisi colturale è scarsamente nota. Ci sono problemi di conta causati da colonie sull'area di conteggio non ben separate o colonie tanto vicine che possono inibirsi a vicenda. In questi casi il coefficiente di variazione percentuale per la stima della precisione può essere anche del 50%. Inoltre i microrganismi nei bioaerosol complessi possono essere difficili da riconoscere, in particolare i piccoli microrganismi. In questa norma oltre all'utilizzo del microscopio ottico per la conta è previsto anche il microscopio a scansione elettronica (SEM) che è uno strumento costoso.

Questi metodi, prevedendo la conta sia delle particelle campionate tal quali (*viable* e non *viable*) sia delle colonie dopo coltivazione, sono laboriosi e comportano lunghi tempi di analisi.

Pertanto, in mancanza di metodi di monitoraggio standardizzati, e allo scopo di dare una informazione quantitativa sulla presenza di materiale fungino totale (*viable* e non *viable*), il presente lavoro ha l'obiettivo di definire una procedura sperimentale per la determinazione quantitativa delle spore fungine in atmosfera, che risulti veloce, affidabile e applicabile agli ambienti *outdoor* e *indoor*.

A tale scopo è stato ottimizzato il metodo di estrazione ed analisi dell'ergosterolo, costituente della parete cellulare di spore fungine, quale indicatore della loro presenza in atmosfera.

1 Il bioaerosol e gli ambienti di lavoro

Con il termine bioaerosol si intende definire il complesso di particelle solide sospese nell'aria provenienti da organismi biologici, compresi i microrganismi (virus, batteri e funghi e loro spore) e i frammenti di materiali biologici, come i residui vegetali, i pollini e i peli di animali. Esso rappresenta perciò un sottoinsieme del materiale particolato atmosferico (PM).

Il bioaerosol è associato ad una vasta gamma di effetti avversi sulla salute umana: irritazione di membrane e mucose, bronchite e malattie polmonari ostruttive, rinite allergica e asma, alveolite allergica (polmonite granulomatosa) o sindrome tossica da polveri organiche (febbre da inalazione o polmonite tossica) [Sorenson & Lewis, 1996; Deguillaume et al., 2008; Després, et al., 2012; Mauderly & Chow, 2008; Zhang et al., 2010].

Gli ambienti di lavoro nei quali si verifica una esposizione al bioaerosol sono quelli dove si producono sostanze biologiche altamente purificate come gli enzimi microbici che vengono utilizzati in particolari settori, o dove è necessario l'utilizzo di organismi biologici, come le aziende di trattamento e riciclaggio dei rifiuti, gli impianti di depurazione, quelle agroalimentari e di trasformazione alimentare, i laboratori di ricerca biotecnologica, le aziende farmaceutiche, le industrie di detersivi.

Tuttavia si verificano esposizioni a bioaerosol anche in ambienti dove i microrganismi non sono utilizzati deliberatamente, come nei luoghi di immagazzinamento di particolari prodotti; negli ospedali e nei laboratori per le procedure post *mortem* o chirurgiche, dove si procede al taglio del legname o nelle aziende di produzione di mobili, in alcune aziende zootecniche e alimentari, sia di produzione che di commercio; le aziende per la lavorazione di filati e tessuti, le concerie, le aziende per la lavorazione di pelli, lana e seta e per la lavorazione di perle, coralli e conchiglie [Lacey & Dutkiewicz, 1994; Bünger et al., 2000].

Infine, sono potenzialmente a rischio biologico i luoghi pubblici, con grande affluenza di persone, come scuole, uffici, centri commerciali, cinema, teatri, mezzi di trasporto.

Gli agenti patogeni includono virus; batteri; spore di actinomiceti, funghi e loro spore, muschi e felci; cellule vegetali e di alghe; insetti e acari e loro frammenti; proteine da fonti vegetali e animali; enzimi, antibiotici e altri prodotti da processi biotecnologici; endotossine da batteri gram-negativi, e micotossine e glucani da funghi [Douwes et al., 2003].

Pertanto, lo studio di sostanze facenti parte del bioaerosol è un problema centrale nel campo occupazionale [Linee Guida CONTARP, 2010] e in particolare L'Agenzia Europea per la Sicurezza e la Salute dei lavoratori (*European Agency for Safety and Health at Work*) nel Rapporto "European Risk Observatory Report" pubblicato nel 2007 e riguardante i rischi biologici emergenti, elenca, tra i principali dieci, le muffe, che sono un tipo di funghi microscopici filamentosi [*European*

Agency for Safety and Health at Work, "European Risk Observatory Report" - EN3 - Expert forecast on Emerging Biological Risks related to Occupational Safety and Health, 2007].

1.1 Funghi e spore fungine

I funghi sono ubiquitari nell'ambiente e comunemente crescono come saprofiti su materiale organico non vivente o come agenti patogeni invasivi nel tessuto vivente. Sono principalmente dispersi come spore sessuali o conidi asessuati, che sono componenti comuni delle aerospore fungine. Le spore hanno struttura unicellulare o pluricellulare, si sviluppano durante diverse fasi del complesso ciclo di vita dei funghi a scopo riproduttivo e di distribuzione; essendo resistenti a condizioni ambientali avverse, garantiscono la sopravvivenza del fungo.

Le aerospore sono la parte biologica dominante nell'aria e la loro presenza è confermata sia negli ambienti *outdoor* che *indoor*.

La crescita dei funghi è favorita dalla temperatura di 18-32° C, umidità relativa superiore al 65% e presenza di substrato organico, come piante, detriti di piante e suolo, legno, prodotti del legno, stoffe, alimenti. I funghi più comuni appartengono ai generi *Penicillium*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Absidia*, *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Stachybotris*.

Il fungo può essere un patogeno che causa infezioni, un aeroallergene, o entrambe le cose insieme. Mentre per causare infezioni, il fungo deve poter crescere a temperatura corporea, proprietà questa comune ad un ristretto numero di specie fungine (membri dei generi *Aspergillus* e *Penicillium*), gli allergeni fungali includono spore da patogeni delle piante come *Cladosporium* e *Alternaria*. Quindi i microrganismi vitali (anche definiti *viable*), compresi i funghi, possono causare malattie nell'organismo ospite, in dipendenza dal potenziale patogeno, dal numero di microrganismi presenti nell'organismo ospite, dall'integrità di difesa dell'ospite. Diversamente, allergeni preformati da frammenti ifali possono suscitare una risposta immunitaria, anche in assenza di germinazione e crescita locale. In definitiva, mentre le infezioni possono essere causate solo da cellule fungine vitali, la componente fungina non ha bisogno di essere *viable* per suscitare una reazione allergica. [Green et al., 2005; Denning et al., 2014]. Gli allergeni provocano ipersensibilità allergiche respiratorie nei soggetti atopici sensibilizzati, causando rinite e/o asma.

Tra i luoghi di lavoro a rischio, a causa della presenza di funghi, ci sono le industrie della trasformazione del legno, di trasformazione e stoccaggio di prodotti vegetali, le aziende agricole e di stoccaggio dei cereali, le industrie farmaceutiche, i laboratori di biotecnologie e di produzione di alcolici, l'industria alimentare per la lavorazione di insaccati, formaggi, funghi, pesce, i forni per il pane, le biblioteche e i luoghi di restauro dei libri, gli allevamenti di bestiame e in genere qualsiasi luogo di lavoro con scarso ricambio d'aria, buio ed umido, o provvisto di sistemi di clima-

tizzazione scarsamente mantenuti [Allergia al lavoro. I principali allergeni presenti nei luoghi di lavoro, Inail, Consulenza tecnica accertamento rischi e prevenzione, 2007].

Pochi dati di concentrazione di spore fungine patogene e/o allergeniche nel bioaerosol sono disponibili, perché non è possibile utilizzare analisi convenzionali per la loro determinazione. Vengono usati principalmente metodi che prevedono il campionamento aerobiologico collezionando le cellule vegetative o su superfici in agar (substrato nutritivo) per garantire una crescita ottimale dei microrganismi o in un mezzo liquido adatto, da sottoporre successivamente ad analisi. Inoltre il campionamento può avvenire per gravità (ha lo svantaggio di non essere un metodo quantitativo, non permettendo di correlare il numero di microrganismi raccolti ad un volume noto di aria) o con flusso forzato di aria. In questo ultimo caso si può causare una condizione di stress che può compromettere la vitalità e quindi la capacità dei microrganismi di riprodursi in terreno di coltura. Per le particelle *viable*, solo dopo idoneo periodo di incubazione, possono essere usate tecniche di rivelazione, come la conta al microscopio, per determinare il grado di contaminazione microbica, espresso come Unità Formanti Colonia, UFC. Questi metodi misurano le colonie che si formano a partire dalle cellule vitali quindi non tengono conto né delle cellule cosiddette VBNC (*Viable But Not Culturable*) né della componente non *viable*. Questa condizione comporta una sottostima dell'esposizione. Nel caso della conta delle particelle totali, cioè vitali e non, si possono usare diverse tecniche: la conta su piastra (HPC), la conta microbica diretta con epifluorescenza, con microscopio ottico o con microscopio elettronico a scansione (SEM), o la reazione a catena della polimerasi in tempo reale (PCR).

Un possibile approccio per una informazione sulla presenza di aerospore fungine in ambienti di lavoro è l'utilizzo di composti chimici che siano indicatori della loro presenza e derivino soltanto da essi-. [Carvalho et al., 2003; Cheng et al., 2008a,b; Bauer et al., 2008a,b].

2 Ricerca della componente fungina del bioaerosol

Il Dit dell'Inail ha studiato la componente fungina del bioaerosol, attraverso l'uso dell'ergosterolo, come biomarcatore [Buiarelli, et al., 2013; Di Filippo et al., 2013]. Per biomarcatore si intende un composto chimico più facilmente analizzabile e che sia un indice della presenza di strutture biologiche complesse più grandi e bioattive, pertanto non facilmente determinabili.

L'ergosterolo è un lipide presente principalmente nella membrana plasmatica dove contribuisce ad una varietà di funzioni cellulari, compresa la fluidità, la permeabilità, e l'integrità della membrana; inoltre controlla l'attività di alcuni enzimi legati alla membrana stessa. L'ergosterolo è stato perciò individuato come indicatore della presenza di materiale fungino in atmosfera, dopo studi in letteratura e prove in laboratorio. Identificato l'ergosterolo (Fig. 1), è quindi necessario determinare un appropriato fattore per convertire la concentrazione del *marker* in biomassa fungina. Tale fattore di conversione è presente in letteratura ed è stato anche calcolato nell'ambito del presente studio, isolando e coltivando le specie fungine tra quelle più diffuse nel sistema oggetto di studio e misurando il carico di *biomarker* in questo sistema.

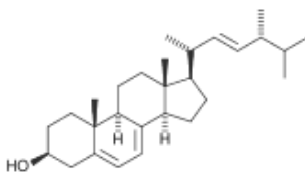


Figura 1: Struttura dell'ergosterolo

2.1 Metodo analitico per la determinazione della componente fungina aero-dispersa

2.1.1 Estrazione

L'estrazione dell'ergosterolo come *biomarker* della componente fungina sia da spore fungine tal quali, sia da materiale particolato aerodisperso (dopo opportuno campionamento) è eseguita tramite estrattore accelerato ad alta temperatura e pressione ASE-200 Dionex (*Thermo Fisher Scientific*, Rodano Milanese - Milano) con etanolo puro (Romil, Delchimica S.G. Srl - Napoli), dopo aggiunta ai campioni del deidrocolesterolo (Sigma Aldrich, Milano) come standard interno.

2.1.2 Purificazione

L'estratto viene purificato, con estrazione in fase solida (SPE), su cartuccia amminica di 200 mg/3 mL (Phenomenex, Castel Maggiore - Bologna) utilizzando un collettore a vuoto (Alltech 12-Port Vacuum Manifold, Alltech Italia srl - Grace Division,

Passirana di Rho, Milano) che è usato per eluire rapidamente gli analiti dalla cartuccia SPE ad un flusso costante. La cartuccia trattiene i composti polari, purificando quindi l'estratto da essi e lasciando eluire nella frazione etanolica l'ergosterolo e lo standard interno.

2.1.3 Derivatizzazione

Allo scopo di analizzare l'ergosterolo e il deidrocolesterolo in gascromatografia è necessario derivatizzare tali composti per renderli volatili. L'eluato etanolico è perciò derivatizzato con N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamide (BSTFA) contenente 1% di trimetilclorosilano (TMCS) e piridina a 70° C per 1 h (Sigma Aldrich srl, Milano) e, dopo evaporazione tramite evaporatore Glas-Col SE500 (Bioanalitica Strumenti srl, Italia) in corrente di azoto, la soluzione è analizzata in Gas Cromatografia associata a Spettrometria di Massa.

2.1.4 Analisi in Gas Cromatografia associata a Spettrometria di Massa

Per le analisi è stato utilizzato un gascromatografo HP 6890 dotato di un campionatore automatico HP 7683 e collegato ad un analizzatore quadrupolare come rivelatore di massa selettivo HP 5973 (Agilent Technologies, Roma). La colonna capillare usata è una Agilent J&W DB-5MS (lunghezza=30 m, diametro interno=0,25 mm, film=0,25 micrometri; Agilent Technologies, Roma). Il programma di temperatura è: temperatura iniziale=100° C, rampa 25° C/min fino a 180° C, rampa 40° C/min fino a 300° C mantenuti per 8 min. I campioni (1 µL) sono iniettati in modalità *splitless*. La temperatura dell'iniettore è fissata a 280° C. Il gas di trasporto è elio mantenuto ad una velocità di flusso costante pari 1,0 mL/min. Le temperature del quadrupolo e della sorgente ionica sono fissate rispettivamente a 150° C e 230° C. Le acquisizioni sono eseguite in modalità SIM (Monitoraggio degli Ioni Selezionati). Gli ioni individuati per l'ergosterolo silanizzato sono lo ione quantificatore: $m/z = 363$ (M-105)⁺; gli ioni qualificatori: $m/z 337 = [M-131]^+$ e $468 = [M]^+$, mentre quelli per il deidrocolesterolo silanizzato sono $m/z 351 = [M-105]^+$ e $456 = [M]^+$. Lo spettrometro di massa opera in modalità EI a 70 eV. In tali condizioni l'ergosterolo (derivatizzato) viene eluito in 11, 7 minuti.

2.2 Analisi quantitativa

2.2.1 Rette di calibrazione in soluzione e qualità del dato

Per tener conto di eventuali perdite durante il trattamento dei campioni, la retta di calibrazione standard è stata costruita aggiungendo, su filtri in teflon puliti, volumi crescenti di soluzioni standard di ergosterolo per sei livelli di calibrazione da 30 a 830 µg L⁻¹ e un volume costante della soluzione di standard interno. I campioni così preparati sono stati trattati seguendo l'intera procedura come da paragrafo 2.1., e iniettati tre volte nel sistema GC-MS. La retta di calibrazione standard è stata costruita riportando i rapporti tra le aree dell'analita e dello standard inter-

no contro la concentrazione dell'analita. Con la procedura proposta il Limite di Rivelabilità (LOD) è pari a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ e il coefficiente di variazione CV (%) = (scarto tipo/valore medio) x 100 è pari al 7 %.

Nell'intervallo di concentrazione riportato, la risposta è lineare ($R^2 = 0,999$) e l'equazione della retta di calibrazione è $y = (0.792 \pm 0.013) x - (0.014 \pm 0.004)$.

2.2.2 Rette di calibrazione in matrice e qualità del dato

Per l'analisi quantitativa dei campioni reali sono state costruite le rette di calibrazione in matrice con l'utilizzo del metodo dello standard interno. Per simulare una matrice reale è stato utilizzato un Materiale Standard di Riferimento (SRM) fornito dal National Institute of Standard and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). La polvere urbana SRM 1649 è una polvere raccolta nella città di Washington per un anno consecutivo e poi setacciata attraverso un setaccio a maglia fine da $63 \mu\text{m}$ (230 mesh). Tale SRM quindi è un particolato urbano che, pur con le sue limitazioni (differente granulometria, diversa città e diverse sorgenti di emissione, media di molti periodi stagionali), può essere considerato come la migliore simulazione possibile dei campioni reali di PM aerodisperso, ai fini della costruzione di una curva di calibrazione in matrice. La curva, costruita riportando la concentrazione degli analiti sull'asse delle ascisse e la risposta strumentale del rapporto analita/standard interno sull'asse delle ordinate, dopo traslazione all'origine degli assi, è usata come curva di calibrazione in matrice per determinare le concentrazioni degli analiti in campioni ambientali atmosferici. La traslazione all'origine degli assi è necessaria per tener conto del quantitativo di analita naturalmente presente nella polvere urbana SRM 1649 [Pomata et al. 2013].

In concreto, un campione di 10,43 mg di polvere urbana NIST SRM 1649, depositato su un filtro in teflon pulito, è stato estratto secondo la procedura descritta nel paragrafo 2.1. e suddiviso in sette aliquote, ciascuna corrispondente all'estratto di rispettivamente 1,49 mg di polvere urbana. Alla prima aliquota è stato aggiunto solo deidrocolesterolo, alle altre 6 aliquote la stessa quantità di deidrocolesterolo ed ergosterolo in quantità crescente da 30 a $250 \mu\text{g L}^{-1}$. Le sette soluzioni sono state purificate, derivatizzate come da procedura descritta nel paragrafo 2.1. e iniettate al GC-MS per tre volte consecutive.

Poiché la concentrazione dell'ergosterolo nel materiale standard di riferimento non è certificata e non esistono altri materiali standard di riferimento, dal metodo delle aggiunte standard appena descritto, è stato calcolato il coefficiente di variazione (CV%) secondo la seguente formula:

$$s_{x_E}^2 = \frac{s_{y/x}^2}{b^2} \left[\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \sum (x_i - \bar{x})^2} \right]$$

dove b è la pendenza della curva di calibrazione; \bar{x} and \bar{y} sono i centroidi dei punti x_i, y_i ; n è il numero dei punti delle addizioni standard e $s_{y/x}$ è la deviazione stan-

dard di y/x . Il valore di CV ottenuto è pari al 14%. Nell'intervallo di concentrazione riportato, la risposta è lineare ($R^2 = 0,999$) e l'equazione della retta di calibrazione è $y = (0.563 \pm 0.010) x + (0.040 \pm 0.003)$.

2.3 Fattori di conversione per convertire il biomarker in massa fungina

La concentrazione di ergosterolo è stata misurata nelle spore di cinque funghi, appartenenti a generi maggiormente diffusi in atmosfera (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Alternaria*). *Alternaria* e *Cladosporium* sono considerati i più importanti allergeni presenti nell'aria outdoor con un andamento prevalentemente stagionale, ubiquitari sul terreno insieme ad altri miceti ambientali, mentre *Aspergillus* e *Penicillium* sono stati riconosciuti come significativi allergeni dell'aria indoor [Fischer e Dott, 2003; Rapporti ISTISAN 13/37, 2013].

I campioni di spore sono stati gentilmente forniti dal Dipartimento di Biologia Vegetale, dell'Università di Roma Sapienza. Le spore fungine sono state coltivate su terreno di coltura *Sabouraud Maltose Agar* per tre giorni a 25°C. Le colture sono quindi trasferite in provette di vetro, lavate con acqua e liofilizzate.

La biomassa secca delle spore fungine provenienti da ciascun fungo è stata estratta e analizzata per l'ergosterolo come descritto nel paragrafo 2.1 e l'analisi quantitativa è stata effettuata utilizzando la curva di calibrazione in solvente.

La Tabella 1 mostra le concentrazioni ($\text{ng } \mu\text{g}^{-1}$) di ergosterolo trovate in ciascuna specie con le relative deviazioni standard; i dati presentati sono le medie di tre estrazioni.

Assumendo una abbondanza percentuale in atmosfera dei generi in elenco rispettivamente di 1.2, 52.0, 21.1, 1.0, 1.0%, come da dati presenti in letteratura [Flückiger et al, 2000; Cheng et al, 2008b; Codina et al., 2008], il fattore di conversione è stato calcolato come media pesata delle concentrazioni del *biomarker* ottenute processando ciascun campione di spore fungine.

La media pesata (WA) del biomarcatore è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$WA = \sum B_i p_i / \sum p_i$$

(B_i = concentrazione i-esima del biomarker e p_i = percentuale i-esima)

cioè come somma della concentrazione di ergosterolo moltiplicata per l'abbondanza percentuale di ogni genere, diviso la somma delle percentuali.

Tabella 1. Concentrazioni di ergosterolo nei cinque generi di spore fungine.

	Ergosterolo (ng μg^{-1})	Distribuzione percentuale in atmosfera
<i>Aspergillus</i>	0,94 \pm 0,18	1,2%
<i>Cladosporium</i>	3,72 \pm 0,55	52,0%
<i>Penicillium</i>	2,06 \pm 0,65	21,1%
<i>Trichoderma</i>	3,40 \pm 0,04	1%
<i>Alternaria</i>	0,94 \pm 0,09	1%
Media pesata	3,2 \pm 1,1	76,3%

Il fattore di conversione calcolato nel presente studio, 3,2 ng μg^{-1} , è coerente con i dati di letteratura che riportano 2,9 ng μg^{-1} , calcolato dai dati riportati in pg indicatore/spore e considerando che il peso medio di una spora è 65 pg [Elbert et al., 2007].

2.4 Quantità di spore fungine trovate in un'atmosfera suburbana/rurale

2.4.1 Campionamento

Il comportamento aerodinamico delle particelle e come queste si comportano se sottoposte ad un flusso di aria è molto importante, in quanto, da questo, dipende la capacità della particella di penetrare e depositarsi presso i diversi siti delle vie respiratorie, durante il processo di respirazione umana. Le particelle in aria possono avere forme e dimensioni diverse, ma avere lo stesso comportamento fisico. Tali particelle convenzionalmente hanno lo stesso diametro aerodinamico (d_a), cioè il diametro di una sfera di densità unitaria (1 g cm^{-3}) che ha un comportamento aerodinamico identico a quello delle particelle in questione.

Il bioaerosol generalmente presenta diametri aerodinamici variabili da 0,3 a 100 μm ; tuttavia la frazione composta da particelle con diametri da 1,0 a 10 μm , è di primaria importanza per le reazioni che può causare negli organismi viventi. Infatti, il particolato con $d_a < 10 \mu\text{m}$, definito "frazione toracica", supera le prime vie respiratorie, continuando a penetrare oltre la laringe, mentre le particelle con $d_a < 1 \mu\text{m}$ difficilmente trasportano spore fungine che sono generalmente nell'intervallo di grandezza 2-10 μm .

Allo scopo di applicare il metodo proposto a campioni reali, è stato quindi effettuato il campionamento del materiale particolato atmosferico PM₁₀.

Il particolato PM10 è stato raccolto outdoor, in una zona mista sub-urbana/rurale, a circa quindici chilometri a sud est dal centro della città di Roma [Latitudine 41° 50'22 "N; Longitudine 12° 38'50" E], con un campionatore a doppio canale *HYDRA-Dual Sampler* (FAI Instrument, Fonte Nuova, Roma). Sono state condotte quattro

campagne di campionamento stagionali in agosto, dicembre, aprile e ottobre, per una durata complessiva di 7 giorni per ciascuna campagna. Poiché il tempo di campionamento per ciascun campione PM₁₀ era di 24 ore, sono stati collezionati 7 filtri per ciascuna campagna per un totale di 28 filtri campionati. Il volume finale di aria campionata era pari a circa 55 Nm³ per ciascun filtro.

2.4.2 Analisi

Ciascuno dei filtri è stato trattato singolarmente secondo l'intera procedura e la concentrazione di ergosterolo è stata determinata utilizzando la curva di calibrazione in matrice e tenendo conto del volume di aria campionato. I risultati sono stati mediati per ciascun periodo stagionale. Il contributo della componente fungina al materiale particolato PM₁₀ è stato ottenuto a partire dalla concentrazione di ergosterolo trovata e utilizzando il fattore di conversione calcolato nell'ambito del presente lavoro. I risultati sono riportati in tabella 2.

Tabella 2: Contributo delle spore fungine al materiale particolato PM₁₀ in quattro periodi stagionali diversi in un'atmosfera semiurbana/rurale nei pressi della città di Roma

Sito suburbano-rurale	Luglio-Agosto	Dicembre	Aprile	Ottobre
	µg spore m ⁻³	µg spore m ⁻³	µg spore m ⁻³	µg spore m ⁻³
	0.05	0.17	0.08	0.24

Tali valori corrispondono ad una percentuale dallo 0,2 allo 0,8% del materiale particolato aerodisperso. I periodi autunnale e invernale presentano in ambiente *outdoor* una concentrazione superiore di spore fungine aerodisperse.

Allo scopo di indagare i livelli di spore fungine, l'utilizzo del *biomarker* ha il vantaggio di misurare anche le spore fungine non coltivabili. Tale metodica ottimizzata nel presente studio può essere applicata non solo ad ambienti lavorativi *outdoor* ma anche agli ambienti *indoor*.

3 Conclusioni

I metodi più comunemente utilizzati per la determinazione delle spore fungine nel bioaerosol prevedono la conta dei microorganismi utilizzando il microscopio, metodo che presenta errori dovuti alla scarsa accuratezza del conteggio stesso e all'incertezza dell'identificazione delle entità microbiche. Inoltre, tali tecniche comportano lunghi tempi di analisi.

Di conseguenza, sono scarse le informazioni disponibili sulla concentrazione microbica nei diversi ambiti lavorativi. A causa di ciò, e anche della variabilità della risposta individuale all'esposizione microbica, non sono stati ancora definiti limiti di esposizione occupazionali.

Attualmente, sono disponibili soltanto proposte orientative, definite da un gruppo di lavoro coordinato dall'Unione Europea, che indicano la qualità dell'aria in funzione della carica microbica (CFU m⁻³). Tale indicazione è limitata solo ai microorganismi *viable*, causa di infezioni.

Il metodo proposto dal Dit dell'Inail, basato sullo studio della concentrazione di ergosterolo, se utilizzato in maniera continua in ambiti lavorativi, darebbe indicazioni sull'andamento e sulle variazioni della concentrazione di spore fungine aerodisperse sia *viable* che *non-viable*. Tali studi, condotti in parallelo con analisi epidemiologiche, potrebbero correlare l'insorgenza delle malattie respiratorie con la salubrità dell'ambiente lavorativo e fornire informazioni riguardo alle misure da adottare a tutela della salute dei lavoratori.

Bibliografia

- Bauer H, Claeys M, Vermeylen R, Schueller E, Weinke G, Berger A, Puxbaum, H. Arabitol and mannitol as tracers for the quantification of airborne fungal spores. *Atmospheric Environment*. 2008a; 42: 588–93.
- Bauer H, Schueller E, Weinke G, Berger A, Hitzenberger R, Marr IL Puxbaum H. Significant contributions of fungal spores to the organic carbon and to the aerosol mass balance of the urban atmospheric aerosol. *Atmospheric Environment*. 2008b; 42: 5542–9.
- Buiarelli F, Canepari S, Di Filippo P, Perrino C, Pomata D, Riccardi C, Speziale R. Extraction and analysis of fungal spore biomarkers in atmospheric bioaerosol by HPLC-MS-MS and GC-MS. *Talanta*. 2013; 105: 142–51.
- Bünger J, Antlauf-Lammers M, Schulz TG, Westphal GA, Müller MM, Ruhnau P, Hallier E. Health complaints and immunological markers of exposure to bioaerosols among biowaste collectors and compost workers. *Occupational and Environmental Medicine*. 2000; 57: 458–64.
- Carvalho A, Pio C, Santos C. Water-soluble hydrolyzed organic compounds in German and Finnish aerosols. *Atmospheric Environment*. 2003; 37: 1775–83.
- Cheng JYW, Lau APS, Fang M. Assessment of the atmospheric fungal prevalence through field ergosterol measurement I—Determination of the specific ergosterol content in common ambient fungal spores and yeast cells. *Atmospheric Environment*. 2008a; 42: 5526–33.
- Cheng JYW, Lau APS., Fang M. Assessment of the atmospheric fungal prevalence through field ergosterol measurement II: Establishing the conversion factor. *Atmospheric Environment*. 2008b; 42: 5534–41.
- Codina R, Fox RW, Lockey RF, DeMarco P, Bagg A. Typical levels of airborne fungal spores in houses without obvious moisture problems during a rainy season in Florida, USA. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 2008; 18: 156–62.
- Deguillaume L, Leriche M, Amato P, Ariya PA, Delort AM, Poschl U, Chaumerliac N, Bauer H, Flossmann AI, Morris CE. Microbiology and atmospheric processes: chemical interactions of primary biological aerosols. *Biogeosciences*. 2008; 5: 1073–84.
- Denning DW, Pashley C, Hartl D, Wardlaw A, Godet C, Del Giacco S, Delhaes L, Sergejeva S. Fungal allergy in asthma—state of the art and research needs. *Clinical and Translational Allergy*. 2014; 4: 1–23.
- Després VR, Huffman JA, Burrows SM, Hoose C, Safatov A, Buryak G, Frohlich-Nowoisky J, Elbert W, Andreae M, Poschl U, Jaenicke R. Primary biological aerosol

particles in the atmosphere, a review. *Tellus Chemical and Physical Meteorology Series B*. 2012; 64: 1–58.

Di Filippo P, Pomata D, Riccardi C, Buiarelli F, Perrino C. Fungal contribution to size-segregated aerosol measured through biomarkers. *Atmospheric Environment*. 2013; 64: 132–40.

Douwes J, Thorne P, Pearce N, Heederik D. Review. Bioaerosol Health Effects and Exposure Assessment: Progress and Prospects. *The Annals of Occupational Hygiene*. 2003; 47: 187–200.

Elbert W, Taylor PE, Andreae MO, Poschl U. Contribution of fungi to primary biogenic aerosols in the atmosphere: wet and dry discharged spores, carbohydrates, and inorganic ions. *Atmospheric Chemistry and Physics*. 2007; 7: 4569–88.

European Agency for Safety and Health at Work, European Risk Observatory Report, EN3. Expert forecast on Emerging Biological Risks related to Occupational Safety and Health. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 2007. 145 p.

Fischer G, Dott W. Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene. *Archives of Microbiology*. 2003; 179: 75–82.

Flückiger B, Koller T, Monn C. Comparison of airborne spore concentrations and fungal allergen content. *Aerobiologia*. 2000;16: 393-6.

Green BJ, Sercombe JK, Tovey ER. Fungal fragments and undocumented conidia function as new aeroallergen sources. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005; 115: 1043–8.

Inail, Contarp. *Allergia al lavoro. I principali allergeni presenti nei luoghi di lavoro*. Milano: INAIL; 2007. 29 p.

Inail, Contarp. *Linee Guida: Il monitoraggio microbiologico negli ambienti di lavoro. Campionamento e analisi*. Milano: INAIL; 2010. 89 p.

Istituto Superiore di Sanità, Gruppo di Studio Nazionale sull’Inquinamento Indoor. Bonadonna L, Briancesco R, Brunetto B, Coccia AM, De Gironimo V, Della Libera S, Fuselli S, Gucci PMB, Iacovacci P, Lacchetti I, La Rosa G, Meloni P, Paradiso R, Pini C, Semproni M. *Strategie di monitoraggio dell’inquinamento di origine biologica dell’aria in ambiente indoor*. Roma: ISS; 2013. 72 p. (Rapporti ISTISAN 13/37).

Lacey J, Dutkiewicz J. Bioaerosols and occupational lung disease. *Journal of Aerosol Science*. 1994; 25: 1371–404.

Mauderly JL, Chow JC. Health effects of organic aerosols. *Inhalation Toxicology*. 2008; 20: 257–88.

Pomata D, Di Filippo P, Riccardi C, Buiarelli F, Gallo V. Determination of non-certified levoglucosan, sugar polyols and ergosterol in NIST Standard Reference Material 1649a. *Atmospheric Environment*. 2014; 84: 332–8.

Sorenson WG, Lewis DM. Organic Dust Toxic Syndrome. Human and Animal Relationships. *The Mycota*. 1996; 6: 159-72.

Zhang T, Engling G, Chan CY, Zhang YN, Zhang ZS, Lin M, Sang XF, Li YD, Li YS. Contribution of fungal spores to particulate matter in a tropical rainforest. *Environmental Research Letters*. 2010; 5:024010.

RIFERIMENTI LEGISLATIVI

D.lgs. 9 aprile 2008, n. 81 e s.m.i. - Testo coordinato con il d.lgs. 3 agosto 2009, n. 106 - Testo unico sulla salute e sicurezza sul lavoro (2009).

UNI EN ISO 14698-1:2004. Camere bianche e ambienti associati controllati - Controllo della biocontaminazione - Parte 1: Principi generali e metodi (2004).

UNI EN ISO 14698-2:2004. Camere bianche e ambienti associati controllati - Controllo della biocontaminazione - Parte 2: Valutazione e interpretazione dei dati di biocontaminazione (2004).

UNI 11108:2004. Qualità dell'aria Metodo di campionamento e conteggio dei granuli pollinici e delle spore fungine aerodisperse (2004).

UNI EN 13098:2002. Atmosfera nell'ambiente di lavoro - Linee guida per la misurazione di microrganismi e di endotossine aerodispersi (2002).

UNI CEN/TS 16115-1:2011. Qualità dell'aria ambiente - Misurazione di bioaerosol - Parte 1: Determinazione di muffe utilizzando sistemi di campionamento di filtrazione e coltivazione (2011).

UNI EN 14031:2005. Atmosfera nell'ambiente di lavoro - Determinazione di endotossine in sospensione nell'aria (2005).

