

INAIL

**Il monitoraggio
microbiologico negli ambienti
di lavoro
Campionamento e analisi**

Edizione 2010

La nuova edizione di questa pubblicazione è stata realizzata da:

per la CONTARP Centrale:

Patrizia ANZIDEI

Liliana FRUSTERI

Raffaella GIOVINAZZO

Federica VENANZETTI

per la CONTARP Umbria:

Elena GUERRERA

per la CONTARP Liguria:

Daniela SARTO

Responsabile di progetto:

Raffaella GIOVINAZZO

Le Linee Guida CONTARP sono ad uso esclusivo degli specialisti dell'INAIL.
È vietata qualsiasi riproduzione e diffusione all'esterno.

PER INFORMAZIONI

Direzione Generale - CONTARP

00143 Roma - Via R. Ferruzzi, 40

Tel 0654872349 - Fax 0654872365

e-mail: contarp@inail.it

Direzione Centrale Comunicazione

00144 Roma - P.le Giulio Pastore, 6

Fax 0654872295

e-mail: dccomunicazione@inail.it

L'edizione è aggiornata al mese di gennaio 2010

ISBN 978-88-7484-162-2

Stampato dalla Tipolitografia INAIL - Milano - gennaio 2010

INDICE

	Pag.
PREFAZIONE	5
PREFAZIONE ALLA PRIMA EDIZIONE	7
IL RISCHIO BIOLOGICO	9
IL MONITORAGGIO AMBIENTALE	11
LE TECNICHE DI CAMPIONAMENTO	13
Campionamento attivo	13
Campionamento passivo	16
Il controllo delle superfici	17
INDICI DI RIFERIMENTO DELLA QUALITÀ DELL'ARIA	18
Campionamento attivo	18
Campionamento passivo	21
RICERCA DI LEGIONELLA NEGLI IMPIANTI IDRICI E AERAILICI	22
IL PROTOCOLLO CONTARP PER IL MONITORAGGIO MICROBIOLOGICO AMBIENTALE	23
Confronto tra campionatori	23
IMPOSTAZIONE DELLA CAMPAGNA DI CAMPIONAMENTO	24
Analisi del ciclo produttivo e degli ambienti di lavoro	24
Scelta dei punti di prelievo	24
Piano di lavoro	26
Scelta del metodo di campionamento	27
Definizione dei parametri di campionamento	27
ASPETTI TECNICI DEL MONITORAGGIO AMBIENTALE	30
Campionamento attivo	30
Campionamento delle superfici	34
Campionamento sul lavoratore	35
IL MICROCLIMA	37
Indicazioni operative	37
Centralina microclimatica	38
Durata	39
Refertazione dei risultati	39
Interpretazione dei risultati	39

TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI	42
Regole generali	42
Trasporto di isolati	43
ANALISI DEI CAMPIONI	44
Incubazione delle piastre	44
Lettura delle piastre	44
Correzione statistica del dato e calcolo delle UFC	47
L'IDENTIFICAZIONE BATTERICA E FUNGINA	49
Tecniche microbiologiche di identificazione	49
L'identificazione di batteri e lieviti tramite Sistema automatico Vitek-bioMerieux	53
CONSERVAZIONE DI CELLULE A BASSE TEMPERATURE	55
Allestimento di colture liquide	55
Preparazione dei campioni per la conservazione a basse temperature	56
Protocolli di utilizzazione di cellule conservate a basse temperature	57
IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DI MICETI	59
REFERTAZIONE DEI RISULTATI	62
RIFIUTI PRODOTTI IN LABORATORIO	63
INCIDENTI ED EMERGENZE	64
BIBLIOGRAFIA CONSIGLIATA	65
ALLEGATI	
1. Dispositivi di Protezione Individuale	73
2. Preparazione dei terreni	75
3. Preparazione delle piastre	76
4. Scheda di indagine microbiologica	78
5. Scheda campionamento microbiologico-carica esterna	80
6. Scheda campionamento microbiologico	81
7. Risultati campionamento microbiologico	83
8. Indicazioni in caso di incidenti o emergenze	84
ATLANTE FOTOGRAFICO	
Conteggio colonie e morfologia colonie	

PREFAZIONE

Con la pubblicazione della prima edizione delle Linee guida sul monitoraggio microbiologico negli ambienti di lavoro (INAIL, 2005) la Consulenza Tecnica Accertamento Rischi e Prevenzione (CONTARP) dell'INAIL ha avviato, al suo interno, la standardizzazione dei criteri e dei protocolli di base da adottare, a livello nazionale, per l'accertamento dei livelli di contaminazione microbiologica nei comparti produttivi oggetto di studio e approfondimento specifico. Ciò a fronte dell'indisponibilità di linee guida nazionali ufficiali, nonché di protocolli standard per l'accertamento del rischio biologico e della molteplicità della strumentazione e delle tecniche di campionamento e analisi degli agenti biologici disponibili sul mercato.

L'utilizzo di procedure univoche su tutto il territorio nazionale ha rappresentato, inoltre, per l'Istituto, il primo passo per l'implementazione di una banca-dati interna omogenea sulla contaminazione da agenti biologici correlata ai cicli produttivi oggetto di indagine da parte della CONTARP, banca dati che, costantemente alimentata dai dati raccolti sul campo, costituisce il presupposto per la valutazione del rischio biologico nei luoghi di lavoro e l'individuazione delle misure di controllo e/o di prevenzione da adottare.

Successivamente alla pubblicazione della prima edizione delle Linee guida, all'interno della CONTARP, sono stati sperimentati confronti interlaboratorio finalizzati all'armonizzazione delle 'letture' dei campioni microbiologici ambientali raccolti su piastre agar, alla luce dei criteri definiti nelle Linee guida stesse. Ciò al fine di migliorare la qualità dei dati analitici prodotti, assicurandone la comparabilità sul territorio nazionale.

Gli aggiornamenti apportati alla seconda edizione delle Linee guida, rispetto alla precedente, tengono conto dell'evoluzione della normativa, delle conoscenze e delle tecniche in materia di monitoraggio ambientale degli agenti biologici, nonché dell'esperienza maturata, in questi anni, dalla CONTARP nelle attività di laboratorio e sul campo.

PREFAZIONE ALLA PRIMA EDIZIONE

La Consulenza Tecnica Accertamento Rischi e Prevenzione dell'INAIL (CONTARP) svolge attività finalizzate all'approfondimento delle varie tematiche inerenti la sicurezza e la salute dei lavoratori e si pone, nell'ambito igienistico-industriale, i seguenti principali obiettivi:

- 1) seguire l'evoluzione dei cicli produttivi
- 2) individuare tempestivamente i fattori di rischio insiti nei processi lavorativi
- 3) accertare i livelli di esposizione dei lavoratori
- 4) suggerire strategie di controllo dei rischi di esposizione del personale
- 5) promuovere la formazione e l'informazione dei lavoratori, finalizzate alla conoscenza del rischio e delle misure di prevenzione individuale e collettiva.

Nell'ambito dell'attività svolta dalla CONTARP, solo da pochi anni il rischio biologico è divenuto oggetto di indagini specifiche nel contesto di studi di settore. Ciò si è verificato a seguito dell'assunzione, da parte dell'INAIL, di professionisti biologi, nonché dell'allestimento del Laboratorio di Igiene Industriale presso la Direzione Generale e della progressiva dotazione di strumentazione per indagini di tipo biologico da parte di alcune Direzioni Regionali dell'Istituto.

Tra le diverse tematiche biologiche affrontate, il monitoraggio microbiologico degli ambienti di lavoro ha rappresentato sicuramente l'impegno più rilevante. I progetti in cui viene effettuato lo studio della qualità microbiologica dell'aria sono numerosi. Per tale motivo è emersa la necessità di uniformare, all'interno della Consulenza, le procedure ed i criteri di campionamento della flora microbica ambientale, nonché i criteri di valutazione della qualità microbiologica dell'aria negli ambienti di lavoro, sulla base dell'esperienza maturata direttamente sul campo e della copiosa letteratura scientifica disponibile in materia. Tale necessità è derivata anche dal fatto che le diverse CONTARP presso le Direzioni Regionali si sono dotate nel tempo, e indipendentemente l'una dall'altra, della necessaria strumentazione, seguendo criteri di scelta diversi basati su valutazioni di ordine economico o connesse alle disponibilità offerte dal mercato.

Pertanto, si è ritenuto opportuno avviare un Progetto per la standardizzazione dei protocolli di acquisizione dei campioni e di messa in coltura dei microrganismi in laboratorio, nonché per l'unificazione dei criteri di lettura e di interpretazione dei risultati ottenuti.

Il protocollo presentato nelle pagine che seguono è frutto delle attività svolte per il confronto fra la diversa strumentazione di campionamento acquisita dalle Consulenze Tecniche dell'INAIL e per l'intercalibrazione delle tecniche di lettura e conta su piastra

adottate dai biologi partecipanti al Progetto suddetto. In questo protocollo vengono, inoltre, uniformati i parametri relativi al campionamento microbiologico ambientale di batteri e funghi e le modalità di refertazione dei risultati da riportare su moduli appositamente predisposti. Vengono, infine, introdotte metodiche di identificazione microbica basate su tecniche molecolari e le procedure di conservazione e trasporto dei campioni da sottoporre a tale tipo di tecnica analitica.

IL RISCHIO BIOLOGICO

La prevenzione e la protezione dagli agenti biologici sono trattate, a livello normativo, nel recente D.Lgs. 81/08, titolo X e successive modifiche (D.Lgs. 106/09). Il decreto si applica alle attività per le quali la valutazione dei rischi ha evidenziato il pericolo di esposizione ad agenti biologici, sia che si tratti di “uso deliberato”, necessario per il ciclo produttivo, sia che sussista solo la possibilità di esposizione dei lavoratori.

Già con il D.Lgs. 626/94 gli agenti biologici erano stati classificati in base alla loro pericolosità valutata in termini di: infettività, patogenicità, trasmissibilità e neutralizzabilità. Tale classificazione, però, non tiene conto dei fattori che possono modulare la risposta all'esposizione nei lavoratori e nella popolazione in generale. I fattori che possono influire sugli effetti dell'esposizione, come per esempio le malattie preesistenti, l'uso di medicinali, uno stato immunitario compromesso o la gravidanza devono, invece, essere valutati al momento di scegliere le misure protettive da adottare, così come riportato nell'art. 279 relativo alla sorveglianza sanitaria.

L'azione patogena svolta dai microrganismi è principalmente di tre tipi:

- azione infettiva, svolta da batteri, protozoi, virus, muffe e lieviti (ad es. *Legionella pneumophila*, *Aspergillus fumigatus* ecc.);
- azione allergizzante, sostenuta da actinomiceti termofili, da microfunghi (*Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, ecc.), protozoi (*Naegleria gruberi*, *Acanthamoeba* ecc.) o metaboliti microbici. In questo caso i soggetti esposti manifestano riniti, sinusiti, asma, alveoliti o febbri, descritte come *Organic Dust Toxic Syndrome* (ODTS).

La pericolosità delle azioni infettive e allergizzanti non è legata solo alla presenza dell'agente patogeno, ma anche all'entità dell'inquinamento ambientale e alla maggiore o minore sensibilizzazione degli esposti;

- azione tossica, svolta da metaboliti quali endotossine, micotossine e 1-3 β -D-glucani. Le endotossine sono costituenti della parete cellulare dei batteri gram negativi, la cui principale azione è collegata all'induzione di febbre e alla necrosi tissutale. Le micotossine hanno un effetto citotossico e sono sintetizzate da alcune specie di funghi, in determinate condizioni di temperatura, umidità o di substrato. Altri metaboliti, quali gli 1-3 β -D-glucani (costituenti delle spore fungine) possono, invece, dar luogo a risposte infiammatorie e immunologiche.

Negli anni '70 è stata descritta anche un'altra patologia nota come “sindrome dell'edificio malato” (*Sick Building Syndrome*, SBS), nelle cui manifestazioni l'inquinamento microbiologico potrebbe giocare un ruolo determinante. Questa sindrome rag-

gruppa un insieme di sintomi aspecifici, quali: irritazione degli occhi, secchezza delle vie respiratorie, cefalea, sonnolenza, eritemi e pruriti cutanei. Ancora oggi non esistono correlazioni certe tra l'insorgenza della SBS e la contaminazione microbiologica, ma alcuni studi hanno rilevato che in edifici caratterizzati da SBS, *Penicillium spp.* rappresenta il 70-100 % dei miceti riscontrati, a differenza dell'ambiente esterno ove predominano altri generi fungini (ad esempio *Cladosporium*).

Per gli agenti biologici, la difficoltà di valutare l'entità dell'esposizione rende la misura della contaminazione ambientale un elemento determinante nella valutazione dell'esistenza del rischio biologico. Inoltre, a differenza di quanto avviene per le sostanze chimiche, nel caso degli agenti biologici, non sono stati definiti limiti di contaminazione utilizzabili come valori soglia; non ci sono, quindi, riferimenti oggettivi in base ai quali gestire i risultati ottenuti dal monitoraggio ambientale.

Gli agenti microbiologici presenti nell'aria, sono aerotrasportati sotto forma di *bioaerosol*, legati a polvere, particelle liquide o altri contaminanti naturalmente presenti (emulsioni oleose, polvere di legno, ecc.), con conseguente rischio, per i lavoratori, di esposizione per via inalatoria, per contatto con superfici e oggetti contaminati o per ingestione.

IL MONITORAGGIO AMBIENTALE

L'interesse per la misura della contaminazione microbica dell'aria si è particolarmente sviluppato negli ultimi venti anni. Questo interesse nasce dalla consapevolezza che i microrganismi aerodiffusi abbiano, alla stessa stregua degli inquinanti chimici classicamente misurati, potenziali effetti nocivi sulla salute degli individui. Tutte le tipologie di microrganismi possono essere presenti nell'aria e sulle superfici: batteri, funghi e protozoi, così come alcuni virus capaci di resistere in un mezzo esterno. Tramite l'aria si diffondono, inoltre, particelle di origine microbica (tossine, frammenti di cellule, allergeni, composti organici volatili) e vegetale (polline).

Prima di effettuare un campionamento microbiologico in un ambiente di lavoro è necessario svolgere un sopralluogo per valutare se il tipo di attività lavorativa svolta comporta l'uso deliberato di microrganismi o una potenziale esposizione agli agenti biologici ed individuare le fasi lavorative a rischio. Il sopralluogo è utile anche per raccogliere informazioni essenziali per poter stilare un protocollo di campionamento dettagliato, in cui vengono elencati i biocontaminanti da campionare, le tecniche analitiche da utilizzare, la durata del campionamento, il numero e la localizzazione dei siti dove effettuare il monitoraggio. È necessario, inoltre, acquisire, tramite letteratura scientifica, eventuali informazioni circa l'esposizione ad agenti biologici nel settore lavorativo in esame.

Nel caso di attività lavorative che comportino un uso deliberato di agenti biologici, si procederà al monitoraggio di tali agenti, che consentirà anche la verifica dell'adozione di corrette procedure operative da parte dei lavoratori e di idonee misure di contenimento ambientale per evitare la diffusione degli agenti biologici. Per le attività nelle quali invece, la presenza di microrganismi, eventualmente anche patogeni, non sia evitabile anche se non c'è uso deliberato, è utile l'applicazione di indici di contaminazione (per esempio enterobatteri e salmonelle come indici di contaminazione fecale negli impianti di trattamento delle acque reflue), che consentono di valutare la salubrità dell'ambiente di lavoro anche senza ricercare lo specifico patogeno eventualmente presente.

Per quegli ambienti di lavoro, come quelli *indoor* (uffici, scuole etc.) per i quali la presenza di agenti potenzialmente patogeni può essere considerata accidentale, la valutazione della carica microbica totale (funghi e batteri) è usualmente sufficiente.

Per attività lavorative nelle quali il rischio connesso alla presenza di agenti biologici è di natura allergica oltre che infettiva, è molto utile affiancare ai campionamenti degli agenti biologici anche la ricerca di allergeni di origine microbica.

In tabella sono elencati alcuni tra i più diffusi generi o categorie di microorganismi in grado di provocare allergie.

Tabella 1: *Alcuni allergeni di origine microbica*

Funghi	
<i>Alternaria</i>	spore
<i>Aspergillus</i>	spore
<i>Cladosporium</i>	spore
<i>Fusarium</i>	tossine
<i>Penicillium</i>	spore
Batteri	
Gram negativi	endotossine

LE TECNICHE DI CAMPIONAMENTO

Il monitoraggio microbiologico ambientale viene eseguito effettuando controlli dell'aria e delle superfici di lavoro. In tutti i tipi di campionamento, le cellule microbiche sospese nell'aria o presenti sulle superfici vengono prelevate e fatte moltiplicare su idonei terreni di coltura, in modo da poterle poi quantificare ed eventualmente identificare.

I metodi di monitoraggio che prevedono la conta batterica su terreno solido e liquido sono in grado di rilevare solo la frazione microbica vitale metabolicamente attiva e, di conseguenza, in grado di riprodursi e di formare colonie visibili. È necessario, a tal proposito, ricordare che la dispersione dei microrganismi nell'aria e le stesse tecniche di campionamento, possono determinare una condizione di stress per i microrganismi stessi, compromettendone la vitalità e la capacità di riprodursi su un terreno di coltura e comportando una possibile sottostima del rischio biologico.

Campionamento attivo

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

I campionatori attivi aspirano volumi predeterminati di aria, convogliandoli su un terreno di coltura liquido o solido. I microrganismi presenti nell'aria aderiscono al terreno e, dopo un adeguato periodo di incubazione, danno origine a colonie visibili a occhio nudo, che si possono numerare e, dopo isolamento, identificare. Il livello di contaminazione microbica si esprime come Unità Formanti Colonie (UFC) per m³ di aria.

Questo metodo di campionamento ha il vantaggio di permettere l'aspirazione di grandi volumi di aria confinata, minimizzando le differenze di distribuzione dei batteri dovute alle correnti, alla temperatura e alle dimensioni degli aggregati aerodispersi.

Dal punto di vista strutturale, i campionatori attivi possono essere dotati di una pompa aspirante a vuoto integrata all'apparecchio o esterna.

Tra i campionatori muniti di pompa esterna, il più usato è il *campionatore multistadio Andersen* (campionatore per impatto). In questo tipo di strumentazione, l'aria aspirata viene fatta passare attraverso una serie di filtri con pori di dimensioni decrescenti in modo che le particelle sospese vengano trattenute, in funzione del loro diametro, sulle superfici di una serie di piastre con terreno nutritivo. Tale tipo di campionatore è tuttavia ingombrante e utilizza, per ogni ciclo di aspirazione dell'aria, fino a 6 piastre. Inoltre, le informazioni che si possono ottenere con il differenzia-

mento dimensionale dei microrganismi non sempre sono utili per il monitoraggio dell'inquinamento aereo. Esistono inoltre campionatori monostadio con pompa esterna conformi alle direttive della norma ISO14698-1 (*BioStage*).

I campionatori monostadio con pompa integrata sono più maneggevoli rispetto ai campionatori multistadio e permettono di rilevare la carica microbica aerodispersa con una approssimazione del 70-80%. Gli strumenti disponibili utilizzano fondamentalmente due criteri di intercettazione delle particelle microbiche: l'impatto tangenziale o l'impatto ortogonale dell'aria sul terreno agarizzato.

Il *campionatore monostadio di Reuter (Reuter Centrifugal Sampler - RCS)*, utilizzato in particolare nelle industrie alimentari, lattiero-casearie o farmaceutiche, è un campionatore d'aria a impatto tangenziale. Il campionatore RCS, a seconda dei vari modelli, aspira al minuto 100, 50 o 40 litri di aria, convogliandola su una striscia di speciale substrato agarizzato. Si tratta di una strumentazione caratterizzata da un'elevata efficienza, anche se la striscia agarizzata tende velocemente a saturarsi, dando luogo alla sovrapposizione ed inibizione delle colonie, elementi che rendono meno facile l'identificazione delle colture pure.

Nei *campionatori monostadio ad impatto ortogonale*, come ad esempio il *Surface Air System (SAS)*, il *Microflow* etc., l'aria aspirata viene inviata sulla superficie di uno specifico terreno di coltura agarizzato, scelto dall'operatore a seconda del tipo di microrganismo da identificare.



Di conseguenza è possibile effettuare un campionamento microbico mirato, riferito alle caratteristiche dell'ambiente da monitorare. Gli apparecchi hanno la possibilità di variare i volumi di aspirazione dell'aria in funzione dei livelli di inquinamento microbico presenti. Per evitare la disidratazione dei terreni nutritivi, la durata dei prelievi è

breve; inoltre, in presenza di alte cariche microbiche, è possibile la sottostima del rischio biologico per fenomeni di aggregazione microbica sulla piastra.

Per il campionamento in *clean room* possono essere utilizzati campionatori ad impatto (*MAS 100 Merks*) che non provocano alcuna turbolenza negli ambienti a flusso laminare.

Il controllo dell'inquinamento microbiologico negli ambienti di lavoro può essere condotto mediante *filtrazione*. Il campionamento mediante filtrazione è un metodo utilizzato ampiamente per gli aerosol di origine chimica, ed è stato adattato al monitoraggio microbiologico. Queste metodologie si basano sull'uso di un mezzo filtrante montato su un portafiltro o inserito all'interno di una cassetta, e collegato ad un sistema in grado di aspirare volumi predeterminati di aria.

Esistono 3 categorie principali di filtri: filtri in fibra, membrane di estere di cellulosa o di altro polimero sintetico, filtri in policarbonato.

I filtri in fibra (ad esempio i filtri in fibra di vetro) sono costituiti da una matrice porosa che intercetta le particelle e vengono principalmente usati per analisi gravimetriche della polvere e degli allergeni.

Le membrane possono essere costituite da esteri di cellulosa, PVC, PTFE o da gelatina. I filtri di estere di cellulosa o di policarbonato sono contenuti all'interno di cassette sterili di plastica e trattengono i microrganismi ambientali grazie alla loro struttura porosa. Il principio del metodo è l'intercettazione sulla superficie del filtro delle particelle di diametro inferiore al diametro dei pori del filtro (variabile da 0,01 a 10 μm). Per esempio un filtro di porosità 5 μm campiona le particelle di 0,3 μm con una efficacia superiore al 95%.

Le membrane di gelatina, anch'esse contenute in cassette sterili (*Via-cell*), possono essere dissolte in un liquido e formano un campione che può essere eventualmente diluito, omogeneizzato e inoculato su terreni di coltura agarizzati. L'analisi dell'inquinamento microbiologico si conclude, anche in questo caso, con il conteggio e l'eventuale identificazione delle specie microbiche sviluppatesi.

Utilizzando una tecnica alternativa, le membrane di gelatina e di acetato di cellulosa possono essere deposte direttamente sulla superficie del terreno agarizzato e successivamente le colonie sviluppatesi possono essere contate. I campionatori per filtrazione hanno una notevole efficienza di raccolta dei microrganismi aerodiffusi e permettono di analizzare con accuratezza ambienti caratterizzati da inquinamento microbico elevato (dissolvendo le membrane di gelatina e diluendo la soluzione) o molto basso (allestendo colture di arricchimento). La tecnica della dissoluzione della gelatina offre inoltre la possibilità di rompere gli aggregati cellulari durante l'omogeneizzazione del campione e permette di effettuare più determinazioni con un unico pre-

lievo di aria. Tra gli aspetti negativi bisogna ricordare che si tratta di un metodo che richiede un'apparecchiatura voluminosa e poco maneggevole. Le membrane tendono, inoltre, a seccarsi facilmente, interferendo sulla vitalità delle cellule campionate. Le membrane di gelatina hanno ulteriori limiti, in quanto possono essere utilizzate solo con una temperatura ambientale inferiore a 30°C e con una umidità massima pari all'85%.

Nei *campionatori Impingers* su liquido (campionatori per gorgogliamento) i volumi di aria aspirati sono fatti gorgogliare in un opportuno mezzo liquido, in cui si raccoglie il particolato aerodisperso. La sospensione così ottenuta, dopo omogeneizzazione e diluizione, viene seminata direttamente su terreno solido. L'utilizzo di un liquido di raccolta favorisce la dispersione degli eventuali aggregati microbici sospesi nell'aria, migliora la coltivabilità dei microrganismi stessi, consente la diluizione del campione in caso di elevata contaminazione. Tuttavia l'utilizzo sul campo dello strumento risulta poco pratico e la facile evaporazione delle soluzioni utilizzate come mezzo di raccolta limita sensibilmente la durata dei prelievi di aria.

Campionamento passivo

Nel campionamento passivo si espongono nell'ambiente in esame, per opportuni intervalli di tempo, piastre contenenti idoneo terreno di coltura: su di esse si raccolgono per sedimentazione i microrganismi veicolati da particelle solide o liquide sospese nell'aria. Dopo opportuna incubazione delle piastre, si procede alla conta del numero di colonie cresciute. L'efficienza di raccolta dipende dalle caratteristiche aerodinamiche delle particelle e dal grado di ventilazione dell'ambiente. Il metodo maggiormente utilizzato a livello igienistico è l'*Indice Microbico Aria* (IMA), il quale esprime il grado di inquinamento microbiologico dell'aria come numero di unità formanti colonia (UFC) che si contano in una piastra Petri di 9 cm di diametro, contenente agar nutriente, lasciata aperta nell'ambiente per un'ora, ad un metro da terra e ad un metro da ogni ostacolo fisico rilevante. Il metodo può essere ulteriormente standardizzato: il rischio di contaminazione ambientale indotto dalla presenza di un operatore può essere ridotto utilizzando uno stativo a cannocchiale che, mediante un programma elettronico, apre e chiude la piastra automaticamente per tempi predefiniti.

L'utilizzo di piastre di sedimentazione, rispetto al campionamento volumetrico dell'aria, presenta il vantaggio di essere più semplice ed economico. Esso è particolarmente vantaggioso per il monitoraggio dell'inquinamento microbiologico in una camera operatoria, in una camera asettica o in una azienda alimentare, in quanto permette di

avere una stima diretta del numero di microrganismi che si depositano sugli oggetti o sugli alimenti presenti in questi luoghi. I campionatori volumetrici, invece, misurando il numero totale di microrganismi vitali presenti nell'aria, forniscono solo un indice indiretto della probabile contaminazione di oggetti o prodotti. Le piastre a sedimentazione, infine, possono essere più facilmente posizionate in vicinanza delle zone di possibile inquinamento.

Il metodo passivo presenta tuttavia diversi svantaggi: non è quantitativo, non permette di correlare il numero di microrganismi a un volume noto di aria ed ha una bassissima sensibilità. È dimostrato, infatti, che esso rileva una carica ambientale notevolmente minore rispetto a quella misurabile con il campionamento attivo effettuato con il SAS. L'efficienza di questo metodo viene influenzata da fattori non sempre riproducibili e controllabili, quali: distribuzione non uniforme dei microrganismi nell'aria, dimensione dei microrganismi e di conseguenza diversa velocità di sedimentazione delle particelle vitali, temperatura dell'ambiente, ridotti volumi di aria campionati.

Il controllo delle superfici

Per la valutazione della contaminazione delle superfici, causata dalla deposizione del bioaerosol sospeso nell'aria e dal contatto con l'uomo o materiali contaminati, si possono utilizzare diverse tecniche: applicazione di piastre Petri di tipo a contatto, tamponi o spugne sterili e *slides*. Le *piastre a contatto* consentono di determinare il valore di UFC riferito all'area di contatto della piastra con la superficie interessata dal prelievo. Il campionamento delle superfici può essere eseguito anche mediante l'utilizzo di un applicatore temporizzato a peso standardizzato, per assicurare maggiore omogeneità di pressione della piastra sulla superficie stessa e pertanto migliore riproducibilità e comparabilità del dato.

Oggetto di valutazione possono essere pareti e superfici sia di piani che di apparecchiature e utensili di lavoro.

In particolari situazioni, ad esempio nel caso in cui le superfici da monitorare siano bagnate, irregolari o non facilmente accessibili, può essere necessario l'utilizzo di *tamponi* o di *membrane di nitrocellulosa*, anziché di piastre. In linea generale, però, l'utilizzo dei tamponi deve essere limitato, perché difficilmente standardizzabile e confrontabile con i risultati ottenuti con le piastre a contatto.

I risultati del monitoraggio consentono di verificare l'efficacia delle procedure di decontaminazione eventualmente adottate.

INDICI DI RIFERIMENTO DELLA QUALITÀ DELL'ARIA

Il D.Lgs. 81/2008 non fornisce valori di carica batterica o micetica a cui rapportarsi per valutare la qualità dell'aria degli ambienti di lavoro.

A livello di contaminazione microbiologica, la differenziazione tra ambiente salubre e insalubre non è così immediata e semplice. L'*American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) non ritiene proponibili valori limite-soglia per i contaminanti biologici. Ciò in conseguenza di diversi fattori, tra i quali l'indisponibilità di relazioni dose-risposta, di procedure standard di monitoraggio, la complessa composizione biologica del bioaerosol, la variabilità della risposta individuale all'esposizione.

Allo stato attuale, per poter pervenire ad un giudizio indicativo sulla qualità microbiologica dell'aria, è possibile soltanto confrontare i valori ottenuti da un monitoraggio ambientale con parametri consigliati.

Campionamento attivo

Nel 1993 la Commissione delle Comunità Europee (*European Collaborative Action*) ha proposto, per gli ambienti *indoor* non industriali, fasce orientative di contaminazione dell'aria (intervalli di concentrazioni totali di UFC), il cui superamento, però, non implica automaticamente l'instaurarsi di condizioni di pericolo o insalubrità (tabelle 2 e 3).

Tabella 2: Valori di carica batterica e valutazione della qualità dell'aria
(*European Collaborative Action*, 1993)

Categoria di inquinamento microbiologico (batterica)	Case (UFC/m ³)	Ambienti non industriali (UFC/m ³)
Molto bassa	< 100	< 50
Bassa	< 500	< 100
Intermedia	< 2500	< 500
Alta	< 10000	< 2000
Molto alta	> 10000	> 2000

Tabella 3: Valori di carica micetica e valutazione della qualità dell'aria
(European Collaborative Action, 1993)

Categoria di inquinamento microbiologico (miceti)	Case (UFC/m ³)	Ambienti non industriali (UFC/m ³)
Molto bassa	< 50	< 25
Bassa	< 200	< 100
Intermedia	< 1000	< 500
Alta	< 10000	< 2000
Molto alta	> 10000	> 2000

Si raccomanda di giudicare la qualità dell'aria di un ambiente confrontando tra loro le cariche microbiche rilevate all'esterno e all'interno di esso. Ovviamente, il rinvenimento di microrganismi patogeni e funghi produttori di tossine costituisce di per sé un elemento di rischio, indipendentemente dalle concentrazioni osservate.

In campo ospedaliero o farmaceutico, la necessità di monitorare il livello di contaminazione microbica dell'aria è oramai riconosciuta ed in molti Paesi sono state approvate norme ufficiali relative a vari settori produttivi (British Standard, 1989; Federal Standard, 1988; ISO/IEC 17025:2005 etc).

In Italia, Dacarro e collaboratori hanno proposto un altro tipo di approccio per la valutazione delle cariche batteriche e fungine ambientali da correlare ad un giudizio sulla qualità dell'aria. Tale approccio si avvale dell'utilizzo di particolari "indici di contaminazione microbiologica" (tabella 4). Poiché diverse sono le categorie microbiche che concorrono alla genesi dell'inquinamento microbiologico *indoor*, viene proposto l'indice globale di contaminazione, IGC_M per la misura complessiva dell'inquinamento microbico ambientale:

$$\text{IGCM} = \text{UFC}_{\text{bat}}(37^{\circ}\text{C}) + \text{UFC}_{\text{bat}}(20^{\circ}\text{C}) + \text{UFC}_{\text{mic}}$$

dove $\text{UFC}_{\text{bat}}(37^{\circ}\text{C})$ e (20°C) sono le UFC di batteri per m³ d'aria, rispettivamente a 37 e a 20 °C e le UFC_{mic} sono le UFC fungine per m³ d'aria, determinate a 20 °C.

L'indice di contaminazione da batteri mesofili *ICM* consente, invece, di valutare il contributo all'inquinamento da parte dei batteri di origine umana e animale, tra i

quali possono essere presenti specie potenzialmente patogene. Negli ambienti confinati tale indice riveste fondamentale importanza ai fini della valutazione dell'efficienza dei ricambi d'aria:

$$ICM = \text{UFCbat}(37^{\circ}\text{C}) / \text{UFCbat}(20^{\circ}\text{C})$$

L'indice di amplificazione *IA* permette di analizzare le differenze tra i livelli di contaminazione esterni ed interni, conseguenti alla attività lavorativa svolta (personale, macchine, materiali):

$$IA = \text{IGCM}/\text{m}^3\text{int} / \text{IGCM}/\text{m}^3\text{est}$$

Valori di IGCM/m³ inferiori a 500 vengono associati, dagli Autori, alla categoria di contaminazione microbica “molto bassa”, mentre valori di IGCM/m³ superiori a 1000 sono collegati ad una significativa contaminazione microbica ambientale.

Tabella 4: *Categorie e classi di contaminazione microbiologica dell'aria proposti da Dacarro e collaboratori (2000)*

Categoria	IGCM/m³	Classe
Molto bassa	< 500	
Bassa	< 1.000	
Intermedia	> 1.000	A: IGCM >1000; ICM <3; IA <3 B: IGCM >1000; ICM >3 o IA >3 C: IGCM >1000; ICM >3 ; IA >3
Alta	> 5.000	D: IGCM >5.000; ICM <3; IA <3 E: IGCM >5.000; ICM >3 o IA >3 F: I GCM >5.000; ICM >3 ; IA >3
Molto Alta	> 10.000	G: IGCM >10.000; ICM <3; IA <3 H: IGCM >10.000; ICM >3 o IA >3 I: IGCM >10.000; ICM >3 ; IA >3

Campionamento passivo

Se si effettua il monitoraggio con tecnica passiva si deve far riferimento alle quattro classi di contaminazione microbica dell'aria, definite dall'IMA (tabella 5):

Tabella 5: Valori limite IMA (UFC/piastra)

Tipologia di ambiente	(UFC/piastra)
Ambienti ad altissimo rischio	
Ultra <i>clean room</i> , isolamento protettivo, sale operatorie per protesi auricolari, alcune lavorazioni dell'industria elettronica e farmaceutica	5
Ambienti ad alto rischio	
Clean room sale operatorie per chirurgia generale, rianimazione, dialisi, alcune lavorazioni dell'industria elettronica e farmaceutica, laboratori di microbiologia	25
Ambienti a medio rischio	
Ambulatori, laboratori, industrie alimentari, cucine, ristoranti, opifici	50
Ambienti a basso rischio	
Corsie d'ospedali, servizi, uffici	75

Il metodo IMA prevede che, in assenza di normative ufficialmente approvate, l'operatore individui quale classe di contaminazione microbica dell'aria adottare come limite massimo per l'ambiente da monitorare, in base al rischio di infezione che questo presenta.

RICERCA DI LEGIONELLA NEGLI IMPIANTI IDRICI E AERAILICI

Le legionelle possono essere responsabili di forme morbose anche gravi (infezioni polmonari e non, e forme subcliniche). Esse si sono progressivamente imposte nel panorama sanitario nazionale e internazionale, al punto da indurre l'istituzione di un sistema di sorveglianza specifico a livello europeo, di un Registro Nazionale della legionellosi, presso l'ISS, e l'emanazione di apposite linee guida sull'argomento, per il controllo del rischio di esposizione.

La legionellosi è malattia soggetta ad obbligo di notifica (classe II).

Legionella spp. e, in particolare, *L. pneumophila* sono incluse nelle liste degli agenti biologici di cui al D.Lgs. N. 81/2008, Allegato XLVI e successive modifiche e al datore di lavoro è fatto obbligo di procedere alla valutazione del rischio specifico, per le sue implicanze sulla salute umana.

Di comune rinvenimento negli habitat acquatici naturali (acque dolci), le legionelle possono, in condizioni ambientali favorevoli, colonizzare habitat artificiali come le reti di distribuzione di acqua potabile, i sistemi di acqua calda sanitaria, i sistemi di climatizzazione, i circuiti di raffreddamento ad acqua, ecc. Un'inadeguata progettazione, installazione e manutenzione degli impianti idrici e aerailici (cioè, impianti di riscaldamento, ventilazione e condizionamento dell'aria) degli edifici può trasformare tali impianti in serbatoi e sorgenti di disseminazione batterica importante, anche a distanza, attraverso fenomeni di turbolenza o aerosolizzazione di acqua, con conseguente sviluppo di bioaerosol contaminato.

In campo occupazionale, ciò si traduce nel rischio di esposizione sia del personale tecnico deputato alla gestione e manutenzione di tali impianti, sia dei lavoratori presenti negli ambienti climatizzati.

Nei casi in cui se ne sospetti la presenza, si deve procedere alla ricerca di legionella in campioni d'acqua prelevati in punti rappresentativi dell'impianto dell'edificio in esame.

L'indagine deve essere preceduta da un'attenta valutazione delle condizioni dell'impianto stesso, congiuntamente alle figure professionali coinvolte nella sua gestione e manutenzione.

Nella 'Bibliografia consigliata', in appendice al volume, si fornisce un elenco delle linee guida nazionali e internazionali, delle indicazioni e dei riferimenti al momento disponibili per la ricerca di *Legionella spp.* in campioni acquosi, la prevenzione ed il controllo della legionellosi e dei rischi igienici correlati ai sistemi aerailici.

IL PROTOCOLLO CONTARP PER IL MONITORAGGIO MICROBIOLOGICO AMBIENTALE

Confronto tra campionatori

Allo scopo di standardizzare le tecniche di monitoraggio microbiologico dell'aria e delle superfici negli ambienti di lavoro, affinché i dati raccolti, a parità di condizioni di campionamento (tipologia di sito di campionamento, stagione, presenza di persone nella stanza, ricambi d'aria etc.), siano il più omogenei possibile, è stato effettuato un confronto tra:

- a) i campionatori attivi in dotazione alla CONTARP, riportati nella tabella 6;
- b) il campionamento di superfici, tramite piastre a contatto, con o senza l'ausilio dell'apparecchio *Rodac-Weight*, per la durata standard di 10 secondi.

Per maggiori approfondimenti circa l'esperimento condotto, si rimanda all'edizione precedente delle Linee guida (2005).

I risultati del confronto non hanno dimostrato alcuna significativa variabilità sia tra gli strumenti presi in esame, nelle condizioni di utilizzo sintetizzate in tabella 6, che tra i campionamenti di superficie realizzati attraverso le due diverse modalità.

Al riguardo, comunque, è opportuno evidenziare che:

- a) l'utilizzo del campionatore Microflow alla portata di 30 litri al minuto per un volume totale di aria aspirata pari a 100 litri, presenta spesso il più elevato indice di variabilità nell'ambito dello stesso campionamento ripetuto in triplo;
- b) i Coefficienti di Variazione relativi ai campionamenti di superficie effettuati, in triplo, tramite l'apparecchio Rodac-Weight, risultano molto più bassi rispetto a quelli realizzati senza l'apparecchio, evidenziando una minore variabilità dei dati nell'ambito delle tre ripetizioni.

Tabella 6: Condizioni operative utilizzate durante lo studio (piastre Petri da 55 mm d.i.)

	SAS super 100	SAS super 180	Microflow		
Portata d'aria Litri/minuto	100	180	30	100	120
Volumi aria campionati (litri)	100	100 180	100	100	120

IMPOSTAZIONE DELLA CAMPAGNA DI CAMPIONAMENTO

Analisi del ciclo produttivo e degli ambienti di lavoro

Prima dell'inizio della campagna di campionamento è necessario effettuare un sopralluogo per un'analisi dettagliata del ciclo produttivo, degli ambienti e delle attività lavorative in essi svolte.

Lo scopo è individuare le possibili fonti di rischio biologico (sorgenti, serbatoi, amplificatori di carica microbica) - in particolare quelle aerodisperse o veicolabili dall'aria - e, di conseguenza, le fasi lavorative o i punti "critici" ed annotare ogni informazione utile per la definizione di un dettagliato protocollo di campionamento, fondamentale per la buona riuscita della campagna di monitoraggio.

In particolare è necessario conoscere:

- caratteristiche e modalità di trasmissione degli agenti biologici di rischio;
- misure o procedure adottate per la prevenzione e il contenimento del rischio;
- numero di ambienti ed eventuale compartimentazione delle fasi del ciclo produttivo;
- caratteristiche generali degli ambienti di lavoro (presenza o meno di finestre, di impianto di condizionamento dell'aria o di ventilazione, tipologia degli arredi, luoghi di sosta o affollamento ecc.);
- materie prime utilizzate nel ciclo produttivo;
- personale presente (numero e mansioni svolte);
- organizzazione del lavoro;
- macchinari e/o impianti presenti, informazioni sulla manutenzione;
- procedure ed eventuale calendario delle pulizie ordinarie dei locali di lavoro.

È anche opportuno acquisire il documento aziendale di valutazione del rischio e il registro infortuni (con evidenza degli infortuni o malattie professionali da agenti biologici) e una mappa dell'impianto e/o degli ambienti di lavoro, sulla quale annotare successivamente la posizione dei punti in cui verrà effettuato il campionamento.

Tutte le informazioni raccolte, unitamente ai dati relativi ad ogni prelievo microbiologico devono essere documentate mediante la redazione di un rapporto di campionamento (Allegati nn.4-7).

Scelta dei punti di prelievo

Durante il sopralluogo preliminare negli ambienti di lavoro, è compito dell'operatore identificare le mansioni potenzialmente esposte a rischio biologico, le postazioni

occupate dagli addetti a tali mansioni durante lo svolgimento di tutto il ciclo produttivo, le superfici ed i punti "critici" da monitorare (ad esempio quelle poste in prossimità di una sorgente di rischio biologico per la presenza di materie prime, lo stoccaggio temporaneo di rifiuti di tipo organico, lo svolgimento di lavorazioni particolari, ecc...).

I prelievi verranno effettuati a livello di questi siti e consentiranno di verificare l'efficacia delle misure preventive o di contenimento del rischio eventualmente adottate.

Una volta individuati, i punti di prelievo devono essere identificati **inequivocabilmente**, ad esempio mediante numeri progressivi, includendo tra essi il sito ove verrà effettuata la valutazione della carica di fondo e il bianco. È, inoltre, necessario riportare tali punti sulla mappa dell'ambiente di lavoro in esame. Le motivazioni alla base della scelta dei punti di prelievo devono essere sempre registrate.

Per la scelta dell'ubicazione dei punti di prelievo può essere utile tenere presenti alcune indicazioni generali, di seguito illustrate, fermo restando che l'operatore adatterà la scelta al contesto lavorativo in esame.

a) Ambienti industriali e artigianali

- Se sono presenti più ambienti fisicamente separati nei quali si svolgono attività diverse, effettuare prelievi in ognuno di questi, nelle postazioni che si ritengono più significative.
- Se nei diversi ambienti, per lo più omogenei tra loro, si svolge la stessa attività, è sufficiente campionare un solo ambiente; si può valutare anche l'opportunità di campionare in tutti gli ambienti nelle stesse postazioni a titolo di verifica in parallelo della stessa attività.
- Se gli addetti non hanno una postazione fissa, ma operano all'interno di uno stesso ambiente, spostandosi frequentemente, il prelievo deve essere effettuato a centro-ambiente.
- Se sono presenti impianti di condizionamento, è necessario effettuare un prelievo anche in corrispondenza della griglia di immissione interna dell'aria, a 30-50 cm di distanza da essa.

b) Ambienti *indoor*

- Effettuare un campionamento a centro- ambiente, tenendo presente l'ubicazione di porte e finestre per la possibile influenza che le correnti d'aria possono esercitare sul campionamento.
- Per ambienti di superficie superiore ai 30 m², effettuare due prelievi lungo la diagonale o lungo la mediana, equidistanti tra loro.
- Se sono presenti sistemi di condizionamento dell'aria, effettuare anche un campionamento a 50 cm di distanza dalla bocchette di mandata e al di sopra del fan-coil.

Piano di lavoro

Il monitoraggio ambientale, in linea generale, è finalizzato alla valutazione del bioaerosol e della contaminazione microbica delle superfici. Esso deve prevedere l'acquisizione di informazioni che, confrontate tra loro, consentano al tecnico di valutare la contaminazione microbiologica in relazione all'attività produttiva svolta (condizioni ambientali, materie prime, attrezzature o macchine utilizzate, ecc.) e all'influenza del personale di lavoro presente, la dinamica della contaminazione stessa nel corso dell'orario di lavoro, l'efficienza dei sistemi di ricambio dell'aria e delle eventuali misure preventive o di contenimento adottate.

Rispettando per quanto possibile l'ordine cronologico dei prelievi proposto, si procederà, quindi, alla:

- valutazione della carica microbica esterna, tramite un prelievo all'esterno dell'edificio, in condizioni di sopravvento e quanto più possibile in prossimità del punto di ingresso dell'aria all'interno degli ambienti da valutare (porte o finestre). In caso siano presenti sistemi di aspirazione localizzata di aria per il ricambio interno (ad es. climatizzatori o ventilatori) sarebbe ottimale effettuare il prelievo in corrispondenza delle loro prese esterne;
- valutazione della contaminazione ambientale "di fondo" (c.d. "bianco"), tramite prelievi a centro- ambiente effettuati prima dell'inizio delle attività lavorative, in assenza di personale, a macchine spente e con impianti di condizionamento/ventilazione spenti;
- valutazione dell'efficienza dei sistemi di ricambio d'aria, se presenti, tramite prelievi in corrispondenza delle bocchette interne, nel punto di ingresso dell'aria trattata, a 50 cm di distanza, in assenza di personale;

- valutazione dell'influenza dell'attività lavorativa sulla qualità dell'aria, tramite prelievi effettuati a centro- ambiente, con il personale presente e in attività, macchine e condizionamento in funzione. In alternativa, effettuare i prelievi a inizio e fine turno di lavoro.

Per contemplare le eventuali variazioni stagionali dei livelli ambientali di contaminazione microbica, si raccomanda di effettuare almeno due campagne di monitoraggio annuali, ad esempio nei mesi estivi e invernali, per cogliere i due estremi microclimatici.

Scelta del metodo di campionamento

Per il campionamento del bioaerosol il metodo attivo risulta essere maggiormente affidabile in termini di efficienza di campionamento e percentuale di rilevazione di microorganismi; esso presenta inoltre il vantaggio di esprimere i risultati in UFC/m³ di aria campionata, rendendo possibili i confronti con i "valori guida" proposti a livello internazionale. Pertanto, per le campagne di monitoraggio, si è scelto di utilizzare tale metodo. Il tecnico potrà valutare l'opportunità di affiancare a tale metodo quello passivo, che, comunque è indicato per il monitoraggio dell'inquinamento microbiologico in ambienti in cui la contaminazione microbica attesa è molto bassa (ad esempio camere operatorie, camere asettiche o aziende alimentari).

L'utilizzo contemporaneo delle due metodiche è meno economico e pratico, ma fornisce un maggior numero di informazioni circa il numero e tipo di microorganismi presenti, e sulla cinetica della loro distribuzione.

Parallelamente al prelievo di bioaerosol è consigliabile eseguire prelievi sulle superfici, in particolare piani di lavoro, attrezzature, macchine, porte e pareti, ecc.

Può essere utile prevedere anche qualche prelievo direttamente sul lavoratore, nel caso per esempio di lavorazioni che implicano la manipolazione di materiali che comportano un potenziale rischio biologico, al fine di valutare l'efficacia delle procedure di lavoro e/o delle misure igieniche preventive o di contenimento adottate.

Definizione dei parametri di campionamento

In base al tipo di monitoraggio che si intende effettuare e al tipo di ambiente che viene indagato, il tecnico definisce preventivamente i parametri microbiologici del campionamento.

In tutti i casi sarà utile prevedere analisi di tipo quantitativo e qualitativo.

a) Analisi quantitativa

Ha lo scopo di valutare i livelli generali di contaminazione microbica attraverso misure di sintesi e, quindi, di ottenere una stima del grado di salubrità ambientale.

I parametri microbiologici- base da ricercare sono i seguenti:

- carica batterica totale psicrofila: si ritiene un valido indicatore della contaminazione batterica ambientale, in quanto i batteri psicrofili hanno temperatura di accrescimento ottimale intorno ai 25°C (range 15°-30°C) e vivono a spese della sostanza organica in decomposizione presente nel suolo, sui vegetali e in genere negli ambienti umidi;
- carica batterica totale mesofila: si ritiene un valido indicatore della contaminazione di origine umana e animale; infatti la flora mesofila ha temperatura ottimale di accrescimento intorno ai 37°C (range 25°- 40°C) ed include anche i patogeni convenzionali;
- carica fungina totale (muffe e lieviti): è un indicatore ambientale molto importante, in quanto è spesso correlato alla presenza di elevata umidità e polverosità, ridotta ventilazione e scarsa qualità dell'aria. Alcune muffe sono responsabili di patologie infettive sull'uomo, nonché di reazioni di ipersensibilità, forme allergiche o tossiche.

Ad integrazione dei suddetti parametri, si può procedere alla rilevazione di *Staphylococcus spp.*, indice di contaminazione antropica e dei batteri Gram negativi, in quanto produttori di endotossine.

In relazione alla tipologia di ambiente di lavoro e alle attività che in esso si svolgono, potrà essere valutata anche la concentrazione di cosiddetti "microrganismi indice", cioè famiglie o generi microbici che possono fornire indicazioni sui livelli di contaminazione connessa allo svolgimento delle attività lavorative a potenziale rischio biologico (ad esempio *Enterobacteriaceae* ed Enterococchi - indici di contaminazione di origine fecale - per le attività di smaltimento rifiuti).

Ai fini dell'interpretazione dei risultati, è necessario ricordare che:

- nel raggruppamento "carica batterica totale" rientrano tanto i possibili agenti di rischio quanto la normale flora saprofita ambientale, normalmente innocua;
- una bassa carica microbica totale aerodispersa non è, di per sé, indicativa di pulizia e salubrità ambientale.

b) Analisi qualitativa

La ricerca di specifici agenti biologici, in quanto estremamente selettiva, può risultare di difficile realizzazione. Pertanto, la necessità di procedere ad analisi qualitative deve essere valutata attentamente, caso per caso, in base ai dati di letteratura disponibili per l'attività o il comparto produttivo in esame o a seguito dell'analisi della casistica epidemiologica.

ASPETTI TECNICI DEL MONITORAGGIO AMBIENTALE

L'operatore che esegue i rilievi ambientali deve indossare dispositivi atti ad evitare la contaminazione delle piastre di campionamento e, se ritenuto necessario, indumenti di protezione e DPI che prevengano l'inalazione del bioaerosol (Allegato n. 1).

DOTAZIONE MINIMA DI UN LABORATORIO MICROBIOLOGICO

Cabina di sicurezza biologica (classe II)
Autoclave
Termostati
Contacolonie
Piastra magnetica riscaldante con agitatore
Frigorifero a +4°C
Microscopio
Consumabile sterile monouso (pipette graduate con filtro, anse, etc.)
Pipettatore
Vetreria Pyrex (autoclavabile)
Bilancia tecnica

Campionamento attivo

a) Strumentazione e parametri di campionamento

Si è scelto di utilizzare un campionatore attivo ad impatto ortogonale, con testata adattabile a piastre Petri di diametro 55-60 mm e 84-90 mm.

Lo strumento deve essere impostato alla portata d'aspirazione (se regolabile) e al volume d'aria da aspirare desiderato. Questi dipendono dalla concentrazione microbica ambientale attesa: i volumi d'aria si riducono in caso di contaminazione alta, per consentire la leggibilità delle piastre, cioè l'esecuzione agevole del conteggio delle colonie cresciute sul terreno nutritivo. Se il livello di contaminazione attesa non è noto, è consigliabile effettuare un campionamento orientativo preliminare, allo scopo di determinare il volume ottimale da utilizzare durante i prelievi successivi.

La portata e la durata dell'aspirazione influiscono, inoltre, sulla disidratazione del terreno nutritivo e quindi sulla coltivabilità dei microrganismi prelevati.

Per la ricerca di specifici microrganismi a bassa concentrazione ambientale, è consigliabile aspirare volumi d'aria maggiori per aumentare la probabilità di campionamento.

I risultati statistici del confronto dei dati ottenuti utilizzando i tre diversi campionatori,

brevemente descritti a pag. 23, pur confermando ai fini interpretativi la sovrapponibilità dei dati raccolti, hanno evidenziato come al variare dei parametri di campionamento, le prevedibili fluttuazioni dei valori ottenuti siano più accentuate con certe condizioni operative piuttosto che con altre. In particolare, per il *Microflow* la portata di aspirazione di 30 litri al minuto, per un volume d'aria campionata di 100 litri, sembra comportare una maggiore dispersione dei valori rilevati. Pertanto, quando, come in questo caso, lo strumento consenta l'impostazione del parametro e l'intento sia di campionare 100 litri o più di aria, è consigliabile evitare la portata minima di 30 litri/minuto.

Calibrazione

Un'accurata calibrazione dei flussi è estremamente importante per la valutazione della contaminazione microbica dell'aria. Si deve, quindi, richiedere la calibrazione dello strumento da parte della Ditta produttrice, con periodicità compatibile con la frequenza di utilizzo dello strumento stesso.

b) Terreni di coltura e parametri di incubazione

I terreni da utilizzare possono essere acquistati già pronti in piastre sterili, oppure essere preparati in laboratorio a partire da terreni disidratati. Per la preparazione dei terreni si consiglia di far riferimento alle istruzioni fornite in merito dalle Ditte produttrici, seguendo le procedure operative riportate nell'Allegato n. 2. Allo scopo di rendere maggiormente confrontabili tra loro i risultati dei monitoraggi ambientali eseguiti da operatori diversi, è consigliabile l'utilizzo dei terreni riportati in tabella 11.

Tabella 11: Terreni e parametri microbiologici

Parametro	Terreno	Diametro piastre mm
Conta batterica totale <i>psicrofila</i>	Tryptic Soy Agar (TSA) Plate Count Agar (PCA)	55-60 o 84-90
Conta batterica totale <i>mesofila</i>	Tryptic Soy Agar (TSA) Plate Count Agar (PCA)	55-60
Conta fungina totale con inibizione della flora batterica contaminante	Sabouraud Agar + Cloramfenicolo (SAB c) Sabouraud Agar + Cloramfenicolo + Gentamicina (SAB cg)	55-60 o 84-90
<i>Stafilococchi</i> <i>Stafilococchi coagulasi positivi</i>	Mannitol Salt Agar (MSA) Agar Baird Parker con RPF (BP)	55-60
<i>Batteri Gram negativi</i> <i>Pseudomonas spp.</i>	Mac Conkey Agar (MCC) Cetrimide Agar (PS)	55-60 55-60

Per la conta totale di muffe e lieviti ed eventualmente, a giudizio del tecnico, anche per la valutazione della carica batterica psicrofila, è preferibile utilizzare piastre di diametro 84-90 mm, anziché 55-60 mm, per facilitarne la lettura dopo incubazione riducendo il rischio di confluenza o inibizione tra colonie cresciute vicine, che può causare una sottostima della carica.

Prima di ogni campagna di campionamento, deve essere saggiata la sterilità delle piastre che verranno utilizzate, incubandone alcune a 37°C per 48 ore, secondo lo schema di seguito riportato:

una piastra per tipo di terreno per lotto	piastre pronte
una piastra per tipo di terreno per gruppo	piastre preparate in proprio

L'estrema variabilità temporale quali-quantitativa che caratterizza il bioaerosol e la brevità della durata del campionamento attivo rendono critico il fattore "ripetibilità" del dato analitico. I dati raccolti durante i campionamenti effettuati per la stesura del presente protocollo hanno, infatti, evidenziato una notevole variabilità (Coefficienti di Variazione) tra i valori microbiologici rilevati in uno stesso ambiente, con lo stesso strumento, in tre campionamenti successivi; si raccomanda pertanto, di effettuare campionamenti in triplo per ciascun punto di prelievo e tipologia di terreno, onde ottenere, calcolando la media dei tre risultati, una stima più accurata della carica microbica. Inoltre, ripetere il campionamento tre volte consente di individuare eventuali valori eccezionali, presumibilmente dovuti a condizioni transitorie imprevedibili (correnti, d'aria, passaggio di persone ecc.), che l'operatore, caso per caso, dovrà valutare se inserire o meno nel calcolo della media.

c) Sterilizzazione delle testate dei campionatori

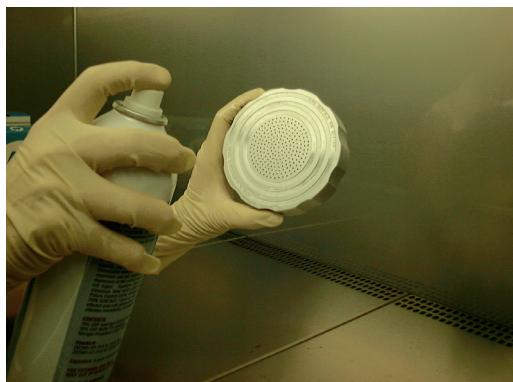
Dopo ogni campionamento, le testate di campionamento in acciaio o in alluminio anodizzato autoclavabile e le relative protezioni in plastica, se disponibili, devono essere sigillate a caldo in idoneo contenitore, sterilizzate in autoclave a 121°C per 20 minuti e opportunamente conservate allo scopo di mantenerne la sterilità.

Durante il monitoraggio, tra un prelievo e l'altro, la testata dello strumento deve essere sterilizzata mediante flambatura o disinfettata con soluzione a base di alcool isopropilico al 70%.

Attenersi scrupolosamente alle istruzioni fornite dal Manuale d'uso del campionatore. Si raccomanda di effettuare la sterilizzazione sul campo ogni volta che si inizia il campionamento in un nuovo punto di prelievo (ambiente o postazione) e, naturalmente, prima di procedere al campionamento del fondo e dell'esterno.

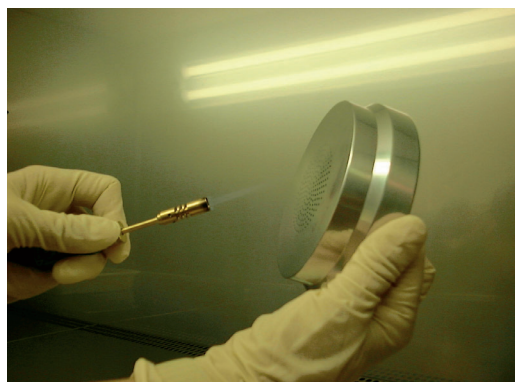
Utilizzo di soluzione disinfettante

Spruzzare una piccola quantità di soluzione sulla parte esterna e su quella interna della testata, ad una distanza di circa 30 cm; lasciare asciugare completamente prima di riutilizzare la testata, per evitare goccioline di condensa, oppure asciugare la superficie con una garza sterile.



Flambatura

Questa soluzione, quando applicabile sullo specifico strumento, risulta più pratica ed efficace. Utilizzare una fiamma libera per qualche secondo sulla parte interna ed esterna della testata ad una distanza di pochi cm; si può ricorrere, per esempio, a piccole saldatrici a gas ricaricabili.



È molto importante, infine, evitare di contaminare la parte forata della testata, toccandola con le mani nude o con i guanti, per non alterare il risultato dei campionamenti

d) Posizionamento dello strumento

Lo strumento deve essere posizionato su stativo, a circa 1.5 m di altezza da terra, orientando la testata in modo da simulare la posizione della testa del lavoratore. Se non è possibile utilizzare lo stativo, il campionatore potrà essere posizionato su un adeguato supporto stabile o, in alternativa, tenuto in mano dall'operatore stesso, mantenendo immutata l'altezza da terra.

L'uso dello stativo agevola l'effettuazione di prelievi in punti ubicati ad altezze dal pavimento maggiori di quella sopra riportata.

Campionamento delle superfici

Lo specialista dovrà valutare di volta in volta l'opportunità di eseguire o meno, negli ambienti di lavoro, campionamenti di superfici, quali ad esempio piani di lavoro, attrezzature, apparecchiature, porte e pareti, superfici interne o ripiani di armadi (ad es. ripostigli di indumenti da lavoro), per valutare il livello igienico ambientale, l'efficacia delle procedure e degli interventi di pulizia e/o decontaminazione messi in atto.

Alcuni criteri in base ai quali eseguire i controlli delle superfici sono i seguenti:

- controllare in parallelo più superfici adibite alle stesse funzioni
- controllare superfici simili sottoposte a diverso trattamento di sanificazione
- controllare le superfici a monte e a valle di un processo produttivo
- monitorare le superfici sottoposte a controlli periodici, per poter escludere o meno il verificarsi di eventi accidentali o anomali.

Il campionamento delle superfici viene eseguito mediante l'applicazione di piastre Petri di tipo "a contatto", cioè con la superficie del terreno leggermente bombata. Sulla piastra appoggiate sulla superficie da monitorare, si esercita una lieve pressio-

ne per alcuni secondi. È raccomandato l'utilizzo di un applicatore temporizzato a peso standardizzato (ad esempio, il *Rodac-Weight, Pbi international*), piuttosto che l'effettuazione manuale dell'applicazione. Infatti, i Coefficienti di Variazione sono risultati molto più bassi quando si è utilizzato il Rodac piuttosto che il campionamento "manuale" per il controllo delle medesime superfici. La durata standard dell'applicazione è di 10 secondi.

L'applicatore deve essere pulito e disinfettato o sterilizzato in autoclave prima di ogni campagna di monitoraggio.

Nel caso in cui i monitoraggi si effettuino su superfici sulle quali si è fatto uso di sanificanti, è opportuno utilizzare per la conta totale terreni contenenti inattivanti per neutralizzare i sanificanti.

Per il monitoraggio delle superfici, effettuato tramite applicatore per piastre a contatto, è consigliabile effettuare i prelievi in triplo sulla medesima superficie in esame, campionando in tre punti significativi per la valutazione dei livelli medi di contaminazione.

Campionamento sul lavoratore

a) Determinazione della contaminazione microbica delle mani

Il controllo microbiologico delle mani consente la verifica dell'adozione di corrette procedure igieniche da parte del personale, per la prevenzione del rischio di contaminazione; inoltre, l'effettuazione di campionamenti prima e dopo il corretto lavaggio delle mani rappresenta un utile strumento formativo per coinvolgere il personale sull'importanza dell'applicazione delle procedure stesse nei luoghi di lavoro.

Si utilizzano, allo scopo, piastre da 84-90 mm riempite con terreni nutritivi adatti alla ricerca dei parametri desiderati (ad esempio, carica totale batterica e fungina). Le piastre devono essere posizionate su un piano stabile, evitando contaminazione esterne durante il sollevamento e la chiusura del coperchio, verificando che il fondo centrimetrato sia orientato correttamente (lettere in verticale e numeri in alto). Si fanno adagiare e premere delicatamente sul terreno, per 10 secondi, i polpastrelli di una mano del lavoratore.

I risultati sono espressi in termini di UFC/5 polpastrelli.

b) Controllo microbiologico su tessuti e indumenti da lavoro

Si esegue soprattutto per le aree di lavoro "a contaminazione controllata", utilizzando piastre di tipo "a contatto" e procedendo come per il monitoraggio delle superfici. Prima di essere esaminato, il tessuto deve essere adagiato su una superficie piana, pulita e disinfettata; si raccomanda di eseguire il controllo in almeno tre punti.

IL MICROCLIMA

La qualità microbiologica dell'aria di un ambiente di lavoro è direttamente influenzata da fattori ambientali e microclimatici che possono determinare o contribuire a sostenere le condizioni ottimali per lo sviluppo e la proliferazione dei microorganismi. Il fattore microclimatico diventa fondamentale negli spazi chiusi, e quindi va da sé che il monitoraggio dei parametri microclimatici ed il controllo dell'aerazione è uno dei principali elementi che concorrono al mantenimento di una buona qualità dell'aria indoor, e contribuisce al buono stato di salute del lavoratore.

Durante la campagna per il monitoraggio della contaminazione microbica degli ambienti di lavoro è, quindi, importante affiancare alle misure microbiologiche misure microclimatiche.

La valutazione di alcuni parametri microclimatici permette di ottenere utili informazioni sulle condizioni ambientali in relazione allo sviluppo dei microorganismi, in particolare temperatura, velocità dell'aria e umidità. Il valore di umidità relativa può essere indicativo di condizioni favorevoli allo sviluppo di condensa del vapore d'acqua sulle pareti e quindi del rischio di formazione di colonie batteriche e/o fungine.

È utile valutare la correlazione del dato dell'umidità relativa con la concentrazione microbica (soprattutto fungina) mediante test statistici; in particolare risulta efficace la correlazione tramite regressione lineare.

Indicazioni operative

Per le misurazioni microclimatiche da effettuare in concomitanza ai rilievi microbiologici si può utilizzare:

- una centralina microclimatica in grado di rilevare i parametri fondamentali, ovvero:
 - temperatura umida a ventilazione naturale
 - temperatura umida a ventilazione forzata
 - temperatura secca a ventilazione forzata
 - temperatura globotermometrica
 - velocità dell'aria
- una sonda termoigrometrica

L'utilizzo di una centralina microclimatica richiede maggiore tempo sia per la misura che per la successiva elaborazione dei dati, ma permette di valutare contemporaneamente sia le condizioni favorevoli alla crescita microbica sia il benessere dei lavoratori, attraverso gli indici di Ranger. La sonda termoigrometrica è uno strumento dall'utilizzo decisamente più agevole e speditivo, ma restituisce informazioni solo per quanto riguarda le caratteristiche ambientali tal quali.

In entrambi i casi le sonde necessitano di un periodo cosiddetto di "acclimatazione" per far fronte alla eventuale differenza di temperatura tra l'ambiente da campionare e l'ambiente da cui provengono gli strumenti. Il tempo di acclimatazione dipende da tale differenza; in ogni caso è utile prevedere un periodo di almeno 10 minuti, durante il quale si può effettuare un rilievo con o senza registrazione del dato.

Centralina microclimatica

a) Impostazioni

È necessario impostare la frequenza di registrazione del dato rilevato dalle singole sonde in base al tipo di ambiente oggetto del monitoraggio, secondo il Manuale d'uso della centralina.

Il parametro che in ambienti chiusi può maggiormente subire variazioni istantanee è la velocità dell'aria: pertanto, è necessario valutare attentamente le condizioni ambientali, per impostare correttamente la frequenza di registrazione della sonda relativa.

b) Posizionamento della centralina

La scelta della postazione in cui effettuare i rilievi microclimatici deve essere effettuata in base all'osservazione dell'ambiente di lavoro, alle postazioni occupate dai lavoratori, ai punti nei quali è stato eseguito il campionamento microbiologico. Possono essere seguiti alcuni criteri generali:

- effettuare il rilievo in corrispondenza dei prelievi microbiologici
- se l'ambiente è piccolo e uniforme: effettuare un solo rilievo al centro del locale

- se vi sono fonti di calore o di basse temperature localizzate: effettuare un rilievo a centro ambiente ed uno nei pressi della fonte di calore, tenendo nota se si tratta di una postazione occupata stabilmente o saltuariamente dai lavoratori
- se vi sono correnti d'aria o fonti di turbolenza dell'aria: effettuare un campionamento in prossimità del punto di ingresso della turbolenza nell'ambiente di lavoro, uno in una postazione che non risente di tale corrente d'aria, ed uno a centro-ambiente.
- se è presente un sistema di condizionamento dell'aria: effettuare un rilievo a centro-ambiente, uno in prossimità delle bocchette di mandata dell'aria.
- effettuare un campionamento in esterno nel punto di prelievo dell'aria immessa nel locale. Il prelievo esterno è utile, così come per il prelievo microbiologico, per poter valutare l'origine delle condizioni indoor riscontrate.

La posizione del rilievo deve essere annotata sulla planimetria dell'ambiente di lavoro e numerata in maniera univoca.

Durata

La durata della rilevazione varia a seconda delle condizioni ambientali e della frequenza di registrazione dei dati impostata; con condizioni di bassa variabilità può essere sufficiente un campionamento di 10-15 minuti.

Refertazione dei risultati

Il dato microclimatico va inserito nella refertazione dei risultati della campagna microbiologica (Allegato n. 7) insieme all'orario di prelievo.

Interpretazione dei risultati

Il monitoraggio dei parametri microclimatici ha una importanza prevenzionale notevole, in quanto permette di conoscere e quindi controllare le condizioni favorevoli allo sviluppo dei microrganismi; in base ai risultati ottenuti risulterà, quindi, utile valutare la qualità dell'aerazione degli ambienti chiusi, secondo quanto indicato dalla normativa tecnica in materia.

Tenendo presente che l'aerazione naturale è da preferire, quando possibile, a quella artificiale, può essere utilizzato un descrittore semplice, ma efficace per stabilire la presenza di una sufficiente aerazione naturale: il Rapporto Aerante (RA) ovvero il rapporto

tra la superficie apribile delle finestre di un ambiente e la sua area in pianta. Un riferimento indicativo per la valutazione del RA può essere costituito dai valori consigliati dal Coordinamento Tecnico Interregionale della Prevenzione dei Luoghi di Lavoro e dall'ISPESL:

- uffici, ambulatori, mense, locali di riposo, aule, locali di degenza: $RA \geq 1/8$
- locali adibiti ad attività lavorative diverse dalle precedenti, compresi i magazzini e gli archivi, occupati da lavoratori:
 - $RA \geq 1/16$ se di superficie $< 1.000 \text{ m}^2$
 - $RA \geq 1/20$ se di superficie compresa tra 1.000 e 3.000 m^2
 - $RA \geq 1/24$ se di superficie $> 3.000 \text{ m}^2$
- locali con posto di lavoro non continuativo: $RA \geq 1/30$

In caso di presenza di aerazione forzata devono essere valutati i parametri indicati dalla normativa tecnica di riferimento.

CONCLUSIONI...

Per la campagna di monitoraggio ambientale è necessario disporre di...

Campionatore/i (controllare se carico!) + accessori (incluso caricabatteria!)

Salviette o soluzione sterilizzante o dispositivo per flambatura

Contenitore per trasporto campioni (+ accessori + contenitori puliti opportunamente identificati, per lo stoccaggio separato delle piastre dopo campionamento)

Piastre sterili opportunamente identificate

Piastre sterili di riserva, non identificate

Salviette tipo *Cleenex*

DPI per accesso luoghi di lavori e/o prelievo in sicurezza e igiene

Nastro parafilm (per il confezionamento finale delle piastre nei contenitori)

Pennarello per marcatura piastre

Planimetria ambiente/i di lavoro, recante l'ubicazione dei punti prelievo

Centralina microclimatica

Modulistica necessaria di accompagnamento

TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Regole Generali

Le condizioni di trasporto devono ridurre al minimo le alterazioni che possono verificarsi nei campioni (stress, moltiplicazione o morte dei microrganismi, contaminazione), a tutela della loro integrità e per evitare esposizione a patogeni da parte di chi li manipola.

Come regola generale devono essere evitati esposizione a caldo o freddo eccessivo ed essiccamento. La consegna al laboratorio analitico deve avvenire nel più breve tempo possibile, in ogni caso entro le 24 ore dal campionamento.

I campioni devono essere confezionati in modo da resistere ad urti o sollecitazioni, evitando che le piastre si rovescino o si aprano durante il trasporto; inoltre, in quanto potenzialmente infetti, deve essere assicurato il mantenimento costante della temperatura *standard* di conservazione (+4°C).

Per garantire il trasporto in condizioni adeguate, è necessario, pertanto, disporre di un frigorifero portatile, meglio se funzionante a batteria, che al momento del prelievo deve trovarsi già alla corretta temperatura di trasporto. In alternativa, per brevi distanze, si possono utilizzare borse-frigo, o contenitori di polistirolo, e panetti refrigeranti, evitando, però, che questi ultimi entrino a diretto contatto con le piastre, con conseguente rischio di congelamento del mezzo di coltura.

Il contenitore deve essere adeguatamente lavato e disinfettato prima e dopo il trasporto, per evitare la contaminazione dei campioni e l'apertura del coperchio deve essere limitata alle operazioni essenziali. Sul contenitore andrà apposta l'etichetta con il segnale di rischio biologico.

All'interno del frigorifero, le piastre devono trovarsi in posizione rovesciata, per evitare perdite di umidità che potrebbero danneggiare i microrganismi e, per agevolare le successive operazioni in laboratorio, devono essere raccolte per gruppi omogenei in contenitori rigidi, opportunamente identificati e sigillati, sulla base delle successive temperature di incubazione.

Le condizioni e le eventuali anomalie verificatesi durante il trasporto devono essere opportunamente documentate.

In caso di spedizione dei campioni, il contenitore esterno deve recare l'indicazione del mittente, del destinatario, della temperatura di trasporto ed essere opportunamente sigillato. L'integrità e la sigillatura del contenitore così come il mantenimento della corretta temperatura devono essere controllati all'arrivo, da parte del ricevente.

Una volta pervenuti in laboratorio, i campioni devono essere registrati e trasferiti immediatamente negli incubatori.

Non è possibile conservare per un tempo superiore alle 24 ore le piastre seminate, né congelarle per effettuare l'analisi in un tempo successivo.

Trasporto di isolati

In alternativa al trasporto di piastre e allo scopo di differire nel tempo i momenti del campionamento e dell'analisi, sia essa morfologica, biochimica o molecolare, è consigliabile l'invio di aliquote di campioni opportunamente conservati in soluzioni di glicerolo sterile, come descritto nel protocollo di pag. 55.

Il trasporto di materiale stoccato in glicerolo sterile presenta alcuni vantaggi di seguito sinteticamente esposti:

- 1) ogni campione è contenuto in una microprovetta da 2 ml, con un evidente risparmio di volumi da trasportare (e risparmio economico)
- 2) è preferibile effettuare la spedizione a temperature basse (circa $+4^{\circ}\text{C}$), ma non è indispensabile: infatti un eventuale trasporto a temperatura ambiente non inficia la qualità del campione, che se necessario potrà essere successivamente diluito in opportune soluzioni di glicerolo al 50% in brodo di coltura
- 3) una volta giunti a destinazione i campioni possono essere direttamente stoccati a -20°C in attesa di essere analizzati.

Condizione imprescindibile al corretto svolgimento delle successive analisi, siano esse morfologiche, biochimiche o molecolari, è che sui campioni inviati in glicerolo siano indicate in modo chiaro le seguenti informazioni:

- a. codifica univoca del campione (rappresentata da un numero progressivo) da cui siano ricavabili le notizie relative al campionamento (data del campionamento, tipo di ambiente di lavoro, n. di piastra, n. di colonia ecc. ecc.)
- b. sigla del terreno di coltura (informazione indispensabile per l'avvio delle analisi, v. tabella II) eventualmente seguita da una lettera che identifichi l'antibiotico addizionato (c= cloramfenicolo, g= gentamicina, ecc.) e il tipo di microrganismo (P= psicrofili ed M= mesofili).

ANALISI DEI CAMPIONI

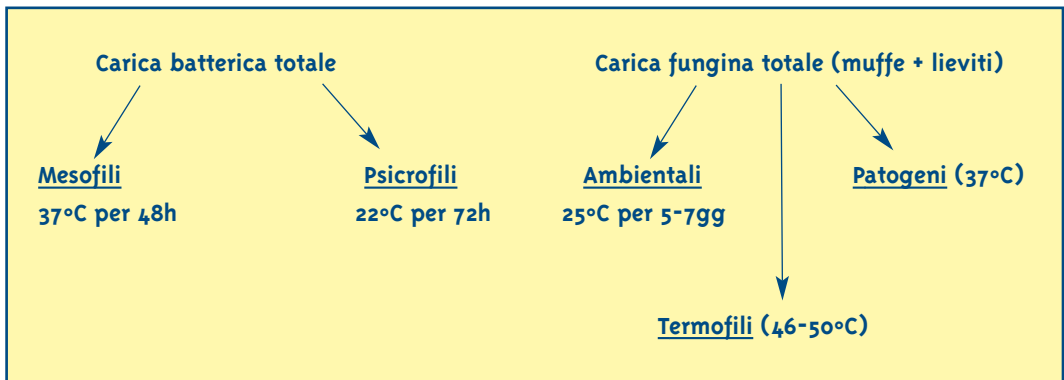
Incubazione delle piastre

Una volta arrivate in laboratorio, le piastre vanno incubate nei termostati capovolte, cioè con il coperchio verso il basso, per evitare perdite di umidità che possono danneggiare i microbi; quelle per la coltura di funghi, invece, vanno tenute con il coperchio verso l'alto, per evitare disseminazione di spore durante la manipolazione e il trasporto.

La temperatura ottimale di crescita differisce tra i diversi microrganismi, anche se molti di essi possono essere coltivati entro un ampio margine di temperatura. In laboratorio, per ottenere lo sviluppo di colonie visibili, quindi numerabili, l'incubazione deve avvenire alla temperatura e per il tempo standard indicati per lo specifico parametro microbiologico da rilevare e il tipo di terreno utilizzato (figura 1).

Per motivi di sicurezza, si consiglia di parafilmare le piastre per i funghi quando esposte su ripiani al di fuori della cappa o degli incubatori.

Figura 1: Condizioni Standard di Incubazione



Lettura delle piastre

Trascorso il periodo di incubazione opportuno, si procede alla lettura delle piastre, cioè all'osservazione macroscopica delle stesse per il conteggio del numero di colonie cresciute. I livelli di concentrazione microbica così determinati rappresentano solo approssimazioni delle concentrazioni transitorie dei microrganismi presenti nell'aria: le condizioni ambientali vigenti e lo stesso campionamento possono, infatti, stressa-

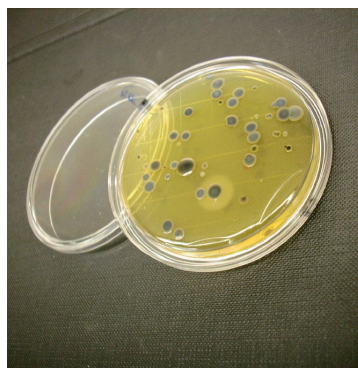
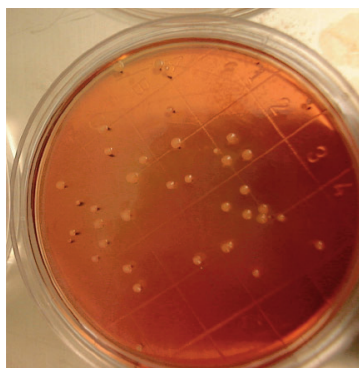
re e/o danneggiare le cellule microbiche mantenendone la vitalità ma inficiandone la coltivabilità in laboratorio. Pertanto, come già sottolineato, possono essere conteggiati solo i microrganismi vitali e coltivabili, con conseguente possibile sottostima della concentrazione microbica reale.

La lettura delle piastre viene effettuata dall'operatore sotto cappa di sicurezza biologica, indossando opportuni DPI (Allegato n.1) e può essere facilitata utilizzando un pennarello, un contacolonie ottico oppure una penna elettronica contacolonie per la registrazione del numero di colonie via via contate.

Per ottimizzare l'osservazione a occhio nudo, la lettura deve essere effettuata sotto luce diretta oppure in trasparenza, nel caso di piastre contenenti agar sangue come mezzo di coltura per rilevare l'eventuale attività emolitica presente.

Qualora si desideri procedere anche all'identificazione del genere o della specie microbica cresciuta, è necessario osservare attentamente e annotare le caratteristiche macroscopiche delle colonie cresciute e le eventuali modifiche subite dal terreno di coltura utilizzato (ad esempio, l'eventuale viraggio del colore, se il terreno è arricchito di indicatori di variazione di pH, come ad esempio l'MSA per l'identificazione presuntiva di *Staphylococcus aureus*, oppure la presenza di un alone opaco attorno alle colonie di stafilococco coagulasi positivo su Baird Parker Agar-RPF, figura 2).

Figura 2: A sin.: terreno MSA, viraggio del colore. A ds.: terreno Baird Parker Agar-RPF, aspetto di una colonia di stafilococco coagulasi positivo



Si procede, quindi, alla conta del numero di colonie cresciute, avvalendosi del fondo centrimetrato della piastra, contrassegnato da numeri e lettere, per la progressiva osservazione di tutta l'area del terreno e l'annotazione delle coordinate delle eventuali colonie da sottoporre ad isolamento ed identificazione.

Per la valutazione della carica batterica, si procederà alla conta delle sole colonie batteriche, escludendo le eventuali colonie fungine (muffe e lieviti) cresciute sul terreno.

Nel corso della lettura, possono verificarsi condizioni particolari, per le quali si propone la seguente modalità di interpretazione/refertazione del dato (v. Atlante fotografico allegato):

- 1) la piastra, dopo opportuna incubazione, risulta ancora sterile (non si osserva crescita): in tal caso, reincubarla alla medesima temperatura per altre 24-48 ore ed osservare l'eventuale sviluppo di colonie a crescita lenta. Nel caso in cui permanesse la condizione di sterilità, refertare il dato finale (UFC) come "assenza di crescita nel volume d'aria/sulla superficie campionato/a";
- 2) le colonie cresciute sul terreno sono ben isolate tra loro e pertanto facilmente numerabili. In tal caso, si annota su apposito modulo il loro numero totale;
- 3) il numero delle colonie cresciute è tale da coprire la superficie del terreno in modo omogeneo. In tal caso, è sempre bene effettuare, se possibile, la conta di tutte le colonie, soprattutto se non è possibile ripetere il prelievo ambientale, modificando opportunamente i parametri operativi del campionatore.
Immaginando l'area della piastra virtualmente suddivisa in quattro quadranti uguali, si procede al conteggio del numero di colonie presenti in un quadrante. Da tale valore, dopo opportuna correzione statistica del dato, si potrà ricavare il numero totale di colonie cresciute sulla piastra;
- 4) le colonie cresciute sono, nella maggior parte dei casi, indistinguibili tra loro o perchè sovrapposte o per interferenza reciproca oppure perchè oscurate da una massiccia sovra-contaminazione fungina (il micelio aereo è così sviluppato da coprire le colonie batteriche sottostanti, rendendone difficoltoso o impreciso il conteggio). In tal caso, il dato viene refertato come "campione non leggibile" (UFC "non numerabili"), seguito da nota esplicativa;
- 5) è possibile a volte osservare lo sviluppo di una patina, (cioè di un'ampia area omogenea di crescita originatasi per confluenza delle colonie) che interessa tutta o gran parte della superficie del terreno. In tale situazione, il risultato finale (UFC) va refertato come "**patina**";

- 6) la presenza di condensa all'interno delle piastre, sotto forma di goccioline di acqua visibili sulla superficie interna dei coperchi, è da imputare ad una non corretta preparazione e conservazione delle piastre stesse (v. Allegato n. 3). La condensa, se non rimossa prima dell'utilizzo delle piastre sul campo, può determinare, nel corso dell'incubazione, la formazione di una area di crescita microbica, più o meno estesa ed omogenea, di aspetto simile a una "**corona**", lungo il perimetro del terreno contenuto nella piastra. Non essendo possibile conoscere il numero delle colonie da cui essa ha avuto origine, potendosi verificare un effetto di trascinamento dei microrganismi esercitato dalla condensa stessa, essa non può essere considerata nel conteggio e, soprattutto se estesa, rende inutilizzabile il campione.

Per la valutazione della carica fungina si procede, nello specifico, alla conta dei nuclei da cui hanno avuto origine le singole colonie fungine visibili (micelio aereo).

La lettura della piastra deve sempre essere effettuata su ambo i lati: si procede, cioè, alla conta delle colonie visibili sulla parte superiore del terreno (miceli aerei); poi si rovescia la piastra, ripetendo il conteggio sul retro. Ciò consente l'inclusione nel conteggio di eventuali colonie fungine più piccole (a crescita lenta) o di lieviti oscurati dal micelio aereo dei miceti a crescita rapida.

Per la refertazione dei conteggi, si applicano i medesimi criteri utilizzati per i conteggi batterici. L'assenza di crescita va registrata solo dopo conferma del mancato sviluppo di colonie sulla piastra oltre i consueti 3-5 gg e fino ad un massimo di 3 settimane consecutive di incubazione.

Correzione statistica del dato e calcolo delle UFC

a) Bioaerosol

Nel corso dell'incubazione, possono verificarsi le seguenti eventualità:

- sovrapposizione di più colonie, in un punto del terreno, non diversificabili tra loro su base morfologica;
- inibizione della crescita da parte di un microrganismo nei confronti di un altro depositatosi sullo stesso punto della piastra;
- possibilità di mascheramento da parte di microrganismi che producono colonie grandi nei confronti di altri produttori di microcolonie;
- oscuramento di microrganismi a crescita lenta da parte di altri a crescita rapida;
- oscuramento di una colonia da parte di un'altra.

Per considerare la probabilità che più di un microrganismo o di una particella impatti sullo stesso punto della piastra, nel corso del campionamento, si deve procedere alla correzione statistica del dato ottenuto dal conteggio (numero di colonie/piastra). A tal fine sono disponibili apposite tabelle statistiche, fornite insieme ai Manuali d'uso dei campionatori.

La concentrazione totale dei microrganismi campionati viene, poi, calcolata dividendo per il volume d'aria campionato (V, espresso in litri) il numero totale (N), statisticamente corretto, delle colonie cresciute, e moltiplicando il risultato per 1000 ($1 \text{ m}^3 = 1000 \text{ L}$). Essa viene, infatti, espressa in termini di UFC per unità di volume d'aria, in genere per m^3 :

$$\text{UFC}/\text{m}^3 = (N / V) * 1000$$

b) Superfici

Nel caso in questione, la densità microbica, espressa in termini di $\text{UFC}/100 \text{ cm}^2$, viene calcolata dividendo il risultato del conteggio (N, numero di colonie/piastra) per l'area di contatto della piastra con la superficie in esame (24 cm^2 per le piastre da 55 mm di diametro e 55 cm^2 per quelle da 84 mm) e moltiplicando il risultato per 100.

Nel caso delle piastre da 55 mm:

$$\text{UFC}/100\text{cm}^2 = N / 24 * 100$$

L'IDENTIFICAZIONE BATTERICA E FUNGINA

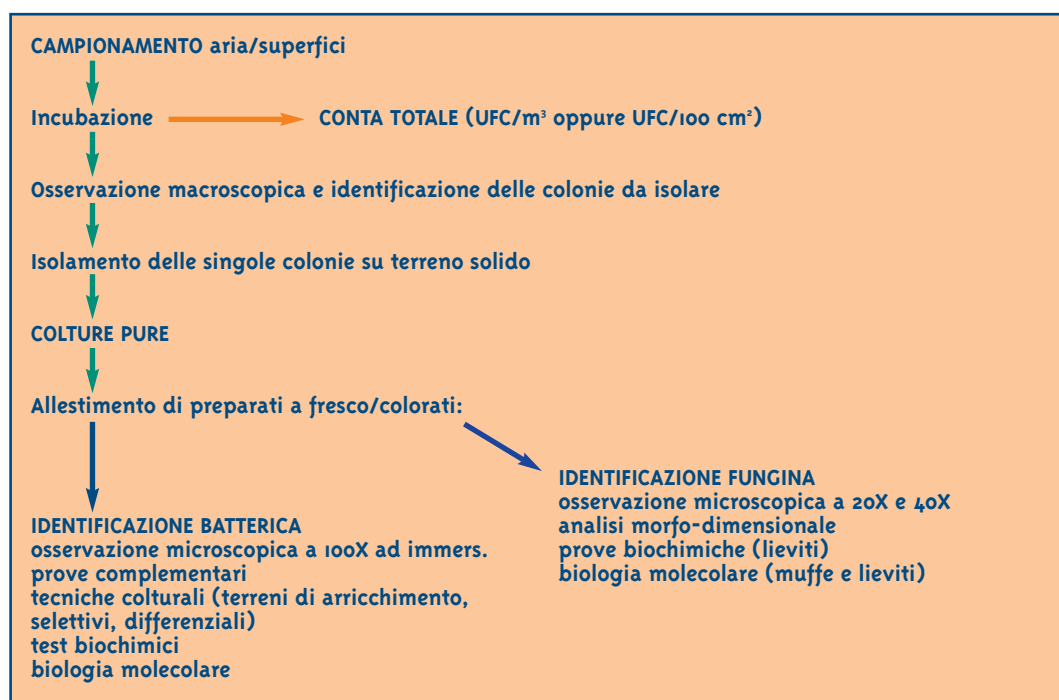
L'identificazione dei microrganismi può essere realizzata tramite tecniche microbiologiche, molecolari e immunologiche.

Le tecniche microbiologiche sono applicabili solo alla frazione microbica vitale e coltivabile. Per facilitare l'identificazione, riducendone i tempi e aumentando nel contempo il numero di campioni analizzabili, sono ormai ampiamente disponibili sul mercato Kit e sistemi multitest di identificazione, anche automatizzati, basati su pattern di reazioni biochimiche (ad esempio, gallerie Api bioMerieux o Sistema Vitek bioMerieux).

Le tecniche di biologia molecolare ed i saggi immunoenzimatici, invece, possono essere applicati sia alla frazione vitale che a quella non vitale dei microrganismi, pur non consentendone una distinzione. Si tratta infatti di saggi qualitativi, anche se sono in fase di studio metodi per ottenere risultati quantitativi.

Tecniche microbiologiche di identificazione

Una volta pervenuti in laboratorio, i campioni (piastre) sono sottoposti al seguente iter analitico:

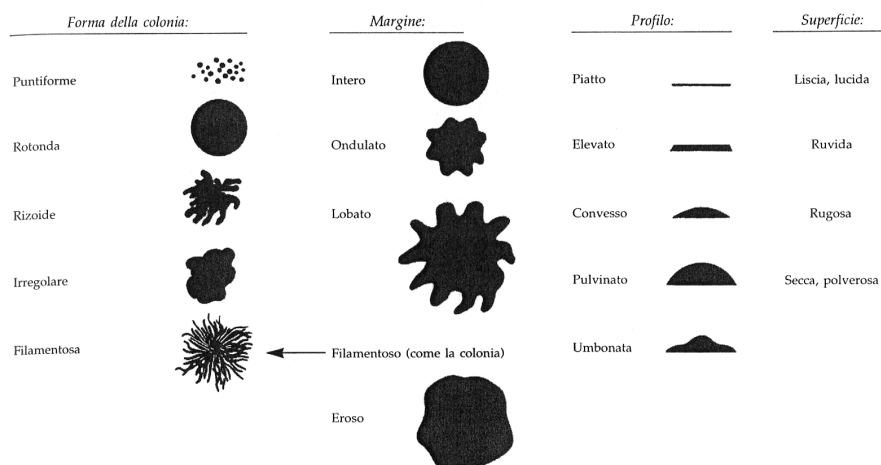


La sequenza-tipo delle operazioni da effettuare è, dunque, la seguente:

1. osservazione macroscopica delle colonie cresciute sulla piastra-madre
 2. individuazione delle colonie da esaminare
 3. allestimento di isolati per ottenere colture pure
 4. osservazione microscopica, saggi colturali, biochimici, immunologici, molecolari.
- L'identificazione, a livello di genere o specie, di un microorganismo richiede l'allestimento preliminare o la disponibilità di colture pure fresche del microorganismo stesso, cioè non più vecchie di 24h. A tal proposito, per evitare di ricorrere a frequenti, periodici trapianti delle colonie in terreni freschi, è possibile il mantenimento delle colture pure a temperature inferiori a quella ottimale di crescita, normalmente a $+4^{\circ}\text{C}$. In alternativa, è possibile allestire colture pure e conservarle a basse temperature per tempi indefiniti, a -20°C , come spiegato nel protocollo a pag. 55. In questo caso, il trapianto in terreno fresco verrà effettuato solo preliminarmente all'esecuzione dei protocolli analitici per l'identificazione.

a) Specie batteriche

Si procede con l'osservazione macroscopica preliminare della colonia originaria selezionata, annotandone le caratteristiche fenotipiche (forma/dimensioni/colore/superficie/trasparenza/ consistenza, ecc.). La terminologia descrittiva della morfologia delle colonie da adottare deve essere univoca; a tal fine, si può far ricorso alla nomenclatura che segue:



Guida ai termini usati nella descrizione delle colonie.

da: H.W. Seeley Jr, P.J. Vandemark, J.J. Lee, Microbes in action. A laboratory manual of microbiology , 1997

Le colture pure della colonia si ottengono tramite ripassi su terreno agarizzato o, nel caso del protocollo propedeutico alla conservazione a basse temperature, in terreno liquido (v. protocollo a pag. 54).

Figura 3: Tecnica di semina sulla superficie di terreno agarizzato



I ripassi su terreno solido si effettuano nel modo seguente: si preleva con l'occhiello di un'ansa una colonia ben isolata sulla superficie del terreno della piastra madre, si distribuisce il materiale su tre quadranti di una piastra sterile contenente terreno PCA o TSA, strisciando l'ansa a zig zag per diluire sufficientemente l'inoculo sulla superficie, in modo da ottenere colonie ben separate tra loro (figura 3).

I ripassi vengono incubati a 37°C per 24h e, osservata la crescita, si preleva con un'ansa dal terreno una colonia ben isolata: con essa si allestiscono su vetrino preparati a fresco - in soluzione fisiologica - e preparati colorati con Gram per osservare al microscopio motilità, forma e disposizione delle cellule, tipo di colorazione ottenuta, presenza di spore o di granuli metacromatici ecc.

Sulla base degli esiti dell'osservazione microscopica, si effettuano prove biochimiche o immunologiche complementari (catalasi, coagulasi, ossidasi ecc.) e saggi colturali per l'identificazione o la conferma della specie microbica (semina su terreni selettivi o differenziali come Agar sangue, MSA, Mc Conkey Agar, Cetrimide Agar, ecc.)

b) Specie fungine (muffe e lieviti)

L'identificazione deve essere effettuata su colture pure fresche della colonia selezionata, ottenute tramite ripassi delle colonia originaria, su piastre da 90 mm riempite di ter-

reno Agar Sabouraud (per tali scopi, si può omettere l'aggiunta di antibiotico al mezzo di crescita). Anche in questo caso, l'identificazione deve essere preceduta dall'osservazione delle caratteristiche morfologiche delle colonie originarie su piastra: dimensioni, forma, colore sia della superficie superiore che inferiore, consistenza, aspetto (vellutato, rugoso, polveroso, cotonoso, lanoso, ecc. - v. Atlante Fotografico allegato).

Il ripasso delle muffe si effettua nel modo seguente: si preleva con l'occhiello di un'ansa sterile un'aliquota della colonia madre dal centro del micelio aereo (in alternativa, si appoggia delicatamente sul micelio la punta sferica di un'ansa, oppure un tamponcino sterile) e la si appoggia poi delicatamente su tre punti distanziati tra loro della piastra sterile, senza strisciare. Le piastre vanno incubate a 25°C per 4-7 giorni. Una volta osservata la crescita, si procede all'allestimento di vetrini colorati tramite la tecnica del nastro adesivo con colorazione al blu-lattofenolo (figura 4 e 5): si posiziona una goccia di colorante al centro di un vetrino portaoggetti; si adagia sulla superficie della colonia fungina la parte adesiva di un pezzo di scotch trasparente tenuto tra due dita, effettuando una leggera pressione per ottenere l'impronta della porzione di micelio selezionata. Si trasferisce lo scotch sul vetrino, in modo che l'impronta (sul lato adesivo dello scotch) vada a posizionarsi sulla goccia di colorante e il nastro adesivo sia ben disteso. Si osservano al microscopio la morfologia e le caratteristiche dell'ifa (struttura vegetativa) e delle strutture riproduttive, avvalendosi anche di chiavi analitiche di identificazione. I vetrini così allestiti possono essere conservati a lungo, a temperatura ambiente.

Un micelio che non ha prodotto spore è detto 'non fruttificante'.

L'identificazione molecolare si effettua tramite analisi di sequenze ribosomali.

Per i lieviti, dopo aver allestito colture pure su terreno Sabouraud Agar, si procede all'osservazione di preparati a fresco in

Figura 4: *Alternaria* spp.

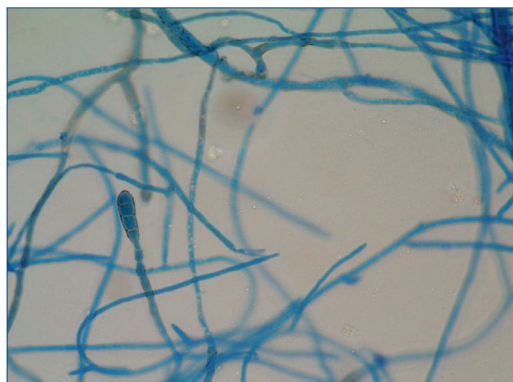
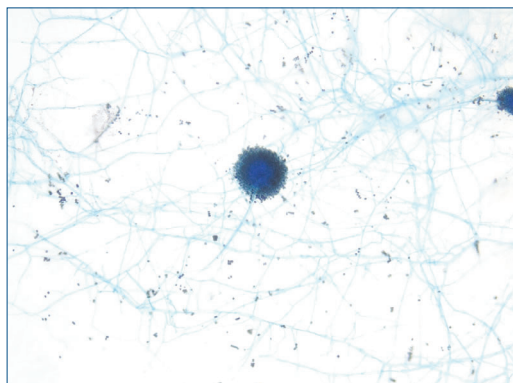


Figura 5: *Aspergillus niger*



fisiologica e dopo colorazione di Gram, per osservare le caratteristiche cellulari. L'identificazione si effettua tramite test biochimici, anche automatizzati, o analisi molecolari. Anche nel caso di muffe e lieviti, l'allestimento di colture pure in terreno liquido è preliminare alla conservazione a basse temperature.

L'identificazione di batteri e lieviti tramite Sistema automatico Vitek-bioMerieux

Il laboratorio di Igiene Industriale della CONTARP ha in dotazione il Sistema automatizzato per l'identificazione rapida, su base biochimica, di batteri e lieviti Vitek-bioMerieux.

a) Requisiti dei campioni da sottoporre ad analisi

Per essere analizzati tramite questo Sistema i campioni devono essere disponibili sotto forma di isolati puri, non più vecchi di 48 ore (24 ore nel caso di batteri Gram negativi), su Agar Sabouraud, se trattasi di lieviti oppure su TSA o TSA+5% sangue di montone, se trattasi di batteri.

b) Identificazione

Lo strumento *Vitek* funziona da incubatore e "lettore" di speciali schede (*cards*) in cui vengono introdotte diluizioni *standard* del campione.

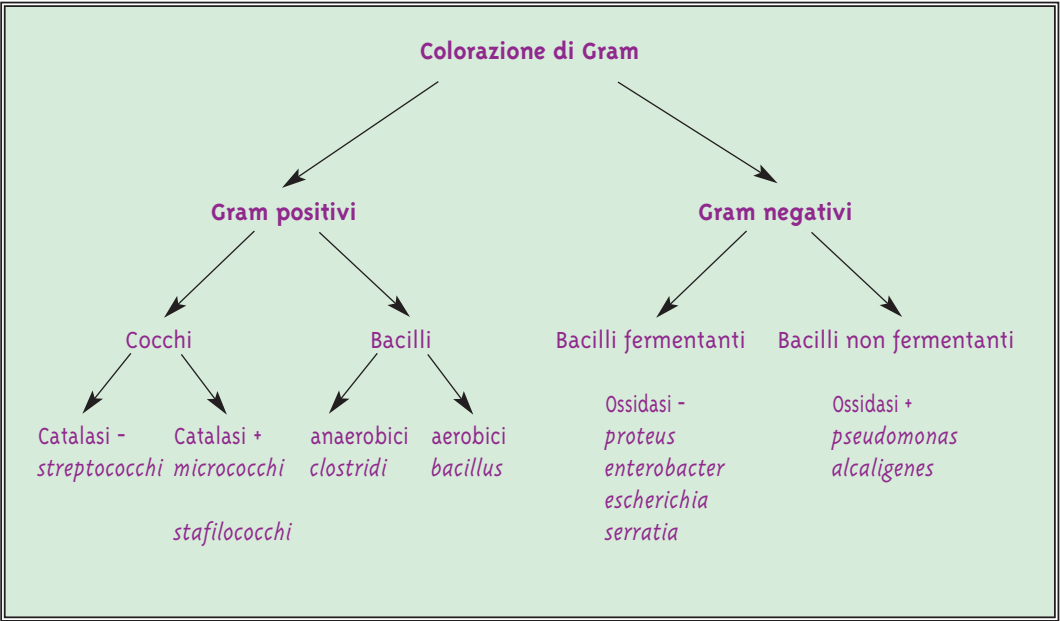
Ogni scheda è costituita da una serie di micropozzetti, contenenti tutti i substrati richiesti per le differenti reazioni di identificazione o altri test. Essa è confezionata singolarmente e, una volta inocolata, deve essere sigillata ermeticamente.

Attualmente, sono disponibili sul mercato schede per l'identificazione, a livello di specie, di diversi raggruppamenti microbici: batteri Gram positivi, Gram negativi, batteri anaerobi, *Bacillus spp.* e lieviti.

L'inoculazione delle schede è preceduta dall'effettuazione di una serie di prove preliminari effettuate sugli isolati freschi in esame (colorazione di Gram, prove biochimiche complementari secondo lo schema classico riportato in tabella 13, ecc.).

Inoculo, incubazione e lettura delle schede, interpretazione e stampa dei risultati vengono poi effettuati in automatico dallo strumento: al termine del ciclo di incubazione, completate le reazioni biochimiche sull'inoculo all'interno delle schede, i risultati dei test biochimici vengono confrontati con la banca-dati del Sistema. Nel rapporto finale viene fornita, per ciascuna scheda, la specie e il *livello di probabilità*, che esprime per l'appunto la probabilità che il microrganismo in esame sia stato identificato correttamente nell'ambito di un dato raggruppamento (la probabilità viene calcolata sulla base del pattern delle reazioni biochimiche determinate dal Sistema *Vitek*).

Tabella 13: Test complementari per identificare colture batteriche (da: H.W. Seeley Jr, P.J. Vandemark, J.J. Lee, *Microbes in action. A laboratory manual of microbiology*, 1997)



CONSERVAZIONE DI CELLULE A BASSE TEMPERATURE

In generale, la conservazione a basse temperature consente di stoccare per lunghissimi tempi (in teoria indefinitamente) cellule vive a temperature molto basse. In tali condizioni le attività metaboliche sono temporaneamente arrestate, le cellule non vanno incontro a divisione e dunque, nel caso di isolati microbiologici, il vantaggio di questo tipo di conservazione consiste nell'evitare agli operatori di dovere periodicamente "ripassare" le colonie in terreni freschi, con spreco di tempo e di risorse economiche. La condizione necessaria perché le cellule rimangano vitali è quella di evitarne il congelamento; nel caso degli isolati microbiologici questo si ottiene con glicerolo sterile. Le cellule conservate a basse temperature possono essere riattivate in qualsiasi momento alle opportune condizioni di temperatura.

Per effettuare la conservazione a basse temperature di colonie di miceti è necessario prima allestire colture in Sabouraud liquido addizionato di Cloramfenicolo (alle concentrazioni suggerite dai fornitori).

Per effettuare la conservazione a basse temperature di colonie batteriche è necessario allestire colture nell'opportuno terreno liquido.

ATTREZZATURA DI LABORATORIO NECESSARIA PER IL PROTOCOLLO DI CONSERVAZIONE A BASSE TEMPERATURE

- 1) micropipette sterilizzabili in autoclave
- 2) micropuntali sterili e con filtro
- 3) provette sterili monouso con tappo a vite (volume 15 ml)
- 4) pipette monouso tamponate, sterili e confezionate singolarmente
- 5) microprovette tipo "eppendorf"
- 6) autoclave
- 7) cappa biologica
- 8) bagnetto termostato con agitazione (o almeno termostato)
- 9) il laboratorio in cui vengono crioconservate le cellule deve essere dotato di un congelatore

Allestimento di colture liquide

- Sotto la cappa biologica, prelevare un'ansata dagli isolati su piastra ed inoculare in 5 ml di idoneo terreno liquido aliquotato all'interno di provette monouso sterili.

Nel caso di muffe compatte e a crescita "crostosa" prelevare una piccola porzione di colonia eventualmente includendo una parte di agar.

- Incubare in bagnetto termostato con agitazione vigorosa (avere cura di inclinare le provette all'interno del bagnetto allo scopo di aumentare la superficie di terreno in agitazione), alle condizioni standard di incubazione specificate nella figura 1.
- Le colture batteriche e di lieviti devono raggiungere la saturazione (il brodo diventa torbido) mentre le muffe formano aggregati di circa 0,5 cm².

Preparazione dei campioni per la conservazione a basse temperature

- Sotto la cappa biologica, per ogni campione in coltura, preparare e marcare con idoneo codice di identificazione 1 microprovetta da 2 ml (vedi pag. 25).
- Aliquotare 1 ml di glicerolo sterilizzato in autoclave. A causa della densità del glicerolo, per questa operazione è preferibile utilizzare una pipetta graduata da 10 ml anziché una micropipetta.
- Preparare sul piano della cappa biologica il seguente materiale:
 1. micropipetta da 1ml
 2. puntali sterili muniti di filtro
 3. spruzzetta contenente ipoclorito di sodio al 5%
 4. fogli di carta per asciugare le mani
 5. guanti
 6. becker contenente ipoclorito di sodio
 7. anse monouso sterili
- Prelevare dal bagnetto termostato le colture precedentemente allestite e portarle sotto cappa.
- Agitare e capovolgere la coltura liquida per permettere alle cellule precipitate sul fondo di andare in sospensione. Questo risulta molto evidente per le colture batteriche e di lieviti che dopo agitazione si intorbidiscono perché le cellule si distribuiscono uniformemente nel mezzo; nel caso delle muffe, di solito, da una colonia principale di grandi dimensioni si staccano piccoli aggregati.
- Utilizzando la micropipetta da 1ml prelevare 800 µl di brodo di coltura dal campione: nel caso dei funghi assicurarsi di prelevare qualche piccolo aggregato cellulare.
- Aliquotare questo volume nel glicerolo contenuto nella microprovetta da 2 ml e chiuderne il tappo.
- Scaricare il puntale direttamente nella provetta contenente ciò che rimane della coltura liquida, aggiungere tramite la spruzzetta 2 ml circa di ipoclorito di sodio alla coltura, chiudere con il tappo a vite e smaltire opportunamente (rifiuti sanitari).

- Prima di passare ad altro campione, pulire la micropipetta con carta bagnata con ipoclorito di sodio. Questo passaggio è fondamentale per prevenire due diversi ordini di problemi:
 1. La contaminazione della micropipetta che potrebbe determinare una successiva contaminazione al di fuori della cappa biologica
 2. La contaminazione crociata dei campioni, che renderebbe inutilizzabili le cellule stoccate in glicerolo oltre ad inficiare qualsiasi successivo tentativo di applicare tecniche molecolari di amplificazione di DNA in vitro.
- Le microprovette contenenti cellule in glicerolo devono essere agitate molto bene per consentire il completo mescolamento di glicerolo e brodo di coltura. Sarebbe preferibile agitarle utilizzando un vortex da bancone. Questo passaggio è critico per impedire il successivo congelamento del brodo di coltura.
- Stoccare le microprovette a -20°C in scatole per la conservazione a basse temperature con la chiara indicazione che il materiale contenuto è conservato in glicerolo.

Protocolli di utilizzazione di cellule conservate a basse temperature

a) Semina in piastra su agar

- Prelevare dal congelatore il campione conservato in glicerolo e lasciarlo sotto la cappa biologica fino al raggiungimento della temperatura ambientale
- Prelevare dal campione 50 μl utilizzando una micropipetta e un puntale con filtro
- Nel caso di muffe, inoculare il volume prelevato al centro di una piastra contenente Sabouraud agar, penetrando con il puntale fino a circa metà dello spessore dell'agar
- Nel caso dei batteri e dei lieviti, seminare alla superficie dell'agar utilizzando le tecniche consuete.
- Senza capovolgere la piastra, incubare in termostato per il tempo e alla temperatura necessari alla crescita della colonia
- A fine lavoro pulire la micropipetta con carta e ipoclorito di sodio e smaltire sempre i puntali utilizzati in un becker contenente ipoclorito di sodio.
- Riporre i campioni stoccati in glicerolo a -20°C avendo cura di agitare bene le microprovette.

b) Semina in terreno liquido in provetta

- Prelevare dal congelatore il campione conservato in glicerolo e lasciarlo sotto la cappa biologica fino al raggiungimento della temperatura ambientale
- Prelevare dal campione 50 µl utilizzando una micropipetta e un puntale con filtro
- Inoculare il volume prelevato in una provetta monouso con tappo a vite contenente 5 ml di brodo di coltura
- Incubare in bagnetto termostato (i miceti per 4-7 giorni a 25°C; i batteri alle temperature e per i tempi opportuni) con agitazione vigorosa, fino al raggiungimento della saturazione (avere cura di inclinare le provette all'interno del bagnetto allo scopo di aumentare la superficie di terreno in agitazione).

IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DI MICETI

L'avvento delle tecnologie molecolari, o del DNA ricombinante, ha profondamente modificato, con importanza sempre crescente, svariate discipline scientifiche, a partire dalla biologia molecolare, fino agli studi ambientali, alle discipline mediche, all'epidemiologia.

In particolare, la scoperta della reazione a catena della polimerasi (PCR) ha determinato un approccio del tutto nuovo ai metodi di identificazione dei diversi organismi, precedentemente basati solo su osservazioni di carattere morfologico o, nel caso dei microrganismi, su evidenze sperimentali dipendenti dal comportamento biochimico. La tecnologia della PCR e del successivo sequenziamento si basa fondamentalmente sui seguenti punti:

- 1) la selezione di regioni target di DNA specifiche;
- 2) l'amplificazione di questa/e regione/i all'interno di una popolazione di sequenze campionate dall'organismo in esame;
- 3) il sequenziamento nucleotidico dei frammenti di DNA precedentemente amplificati;
- 4) l'identificazione dell'organismo tramite confronto con banche dati di sequenze omologhe.

L'identificazione molecolare dei miceti viene effettuata, nella maggior parte dei casi, analizzando il DNA ribosomale, che consiste di tre geni, il 25S, il 18S, il 5.8S, separati dalla regione degli spaziatori interni trascritti (ITS). Quest'ultima regione è di cruciale importanza per la diagnostica fungina, poiché ha aree estremamente conservate (che consentono di utilizzare primers universali per le reazioni di amplificazione) e aree altamente variabili, la cui analisi consente di risalire al rango di genere o al rango specifico delle colonie in esame.

La sistematica fungina, basata su tecniche tradizionali, è molto complessa e richiede tempi piuttosto lunghi; inoltre, la differenziazione morfologica di specie con caratteristiche fenotipiche in comune può portare ad attribuzioni tassonomiche incerte. Per queste ragioni, la tendenza attuale delle discipline afferenti alla micologia è di fare ricorso alle tecniche di sistematica molecolare.

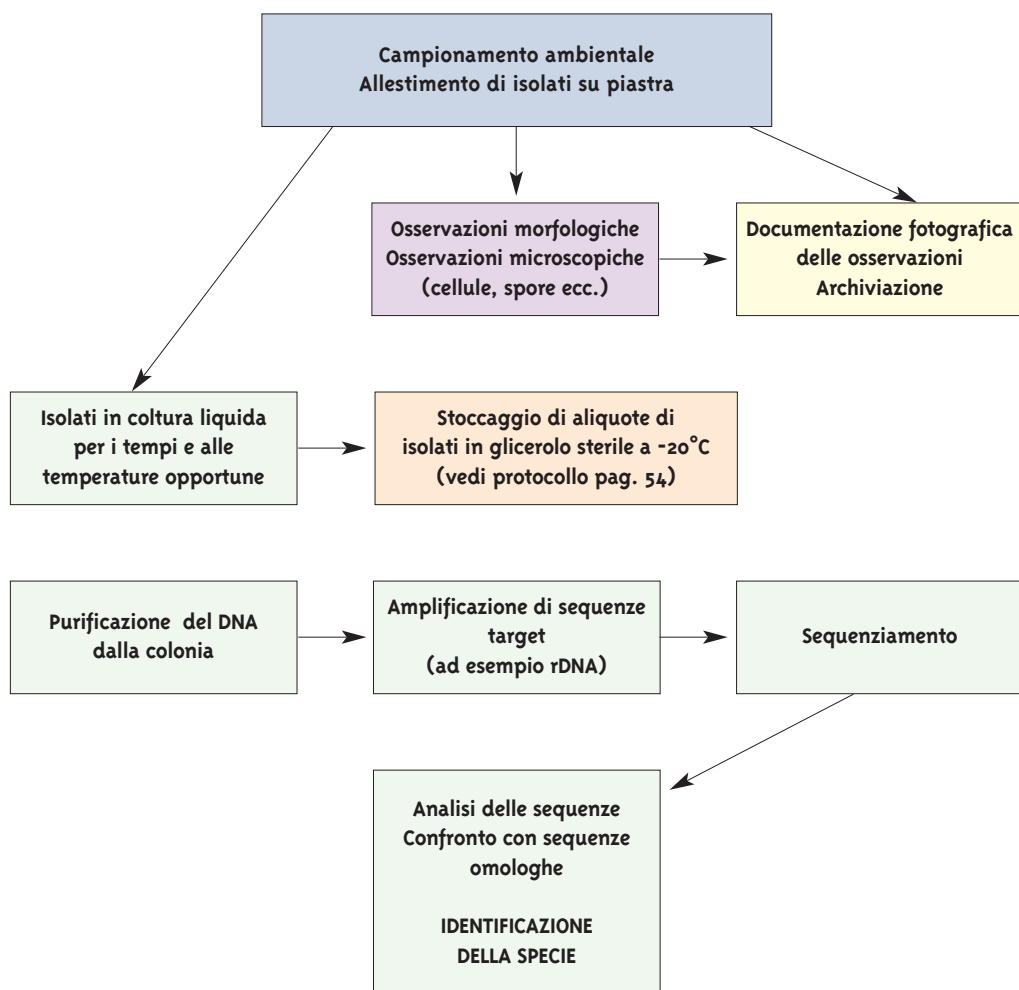
L'importanza di effettuare delle identificazioni rapide ed affidabili diviene inoltre cruciale quando i campioni in esame sono rappresentati da miceti patogeni.

È tuttavia fondamentale sottolineare che la sistematica molecolare non dovrebbe mai sostituirsi ad approcci di altro tipo, ma semmai integrarli: osservazioni generali di carattere ecologico, morfologico e microscopico rimangono le informazioni di base imprescindibili per validare definitivamente la successiva diagnosi molecolare.

Per questo è necessario organizzare e gestire un archivio documentale che consenta di

attribuire le caratteristiche fenotipiche della colonia di provenienza ad ogni campione di DNA analizzato e successivamente identificato sulla base del confronto con sequenze omologhe.

L'identificazione molecolare delle specie microbiche o fungine presenti in un campione di aria o su una superficie si può effettuare a partire da isolati su piastra, come successivamente schematizzato:



Il Laboratorio di Igiene Industriale della CONTARP ha la dotazione strumentale appropriata per le tecniche di sistematica molecolare.

Più in particolare, questa consiste di:

- a) attrezzatura di base per l'esecuzione di protocolli di biologia molecolare
- b) *Termocycler* per le reazioni a catena della polimerasi
- c) Analizzatore genetico per il sequenziamento automatico dei frammenti di DNA amplificati.

REFERTAZIONE DEI RISULTATI

Al termine della campagna di campionamento deve essere predisposto un rapporto finale (referto), che deve contenere almeno le seguenti informazioni (Allegato n. 7):

- nome o identificativo dell'ambiente di lavoro in cui è stato effettuato il monitoraggio;
- identificativo del campione;
- documentazione relativa al campionamento;
- risultati, espressi nell'unità di misura propria del metodo di campionamento utilizzato per le diverse matrici.

Allo scopo di formulare un giudizio sulla qualità microbiologica dell'aria dell'ambiente di lavoro campionato e sulla possibile esposizione del personale durante le attività lavorative è utile, infine, confrontare i valori ottenuti con i riferimenti disponibili, ed esprimere un giudizio in termini di: contaminazione molto bassa/bassa/media/alta/altissima, tenendo presente che si tratta, comunque, di giudizi informativi e del tutto indicativi, basati su una scala di livelli di contaminazione suscettibile di ulteriori modifiche.

RIFIUTI PRODOTTI IN LABORATORIO

Nel corso delle attività di lavoro effettuate sotto cappa, i materiali utilizzati per le tecniche microbiologiche e/o molecolari (puntali, anse, provette, ecc.) devono essere immersi dopo l'uso in soluzione di ipoclorito di sodio al 5% per almeno 15 minuti. Sotto cappa, l'esposizione diretta, per almeno 30 minuti, a raggi UV consente la sterilizzazione di tutto il materiale presente sul ripiano e, di conseguenza, lo smaltimento in sicurezza.

Come regola generale, tutti i materiali di laboratorio contaminati, in quanto a potenziale rischio infettivo, devono essere raccolti in sacchetti di plastica per autoclave, sigillati e sterilizzati prima dello smaltimento.

Contenitori per rifiuti

La raccolta dei rifiuti deve essere effettuata per tipologie omogenee.

I contenitori per rifiuti non devono essere riempiti per più di $\frac{2}{3}$ del loro volume.

Essi devono essere chiusi al termine della giornata di lavoro e smaltiti nel più breve tempo possibile, nel rispetto della normativa vigente.

In laboratorio deve essere garantita la seguente dotazione-base di contenitori per rifiuti:

1. contenitori monouso in cartone, da 60L - muniti di sacco di plastica interno e apposito legaccio per la chiusura - per "rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo". Sui contenitori, dopo la chiusura, devono essere apposti il nome della Struttura produttrice dei rifiuti e la data del confezionamento;
2. contenitori rigidi in plastica, per "rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo taglienti e pungenti";
3. contenitori per il deposito del vetro;
4. contenitori o taniche tappati per la raccolta di rifiuti liquidi, ciascuno munito di etichetta riportante la tipologia di rifiuto contenuta.

INCIDENTI ED EMERGENZE

Ogni laboratorio deve disporre di procedure di sicurezza e di emergenza, fornite dai soggetti individuati dalla normativa vigente in materia di salute e sicurezza dei lavoratori.

Nell'Allegato n. 8 si riportano alcune indicazioni di base da seguire in caso di emergenza, che potrebbero andare ad integrare le procedure già esistenti.

BIBLIOGRAFIA CONSIGLIATA

1. A.A.V.V.: Manuale di sicurezza per il personale dei laboratori di ricerca biotecnologica (a cura di: Sossai D., Miele M., Bet P), 2001 Erga Edizioni.
2. Abdel Hameed A.A., Khoder M.I., Farag S.A.: Organic dust and gaseous contaminants at wood working shops. *J. Environ. Monit* , 2000 (2):173-6.
3. ACGIH: Bioaerosols assesement and control,1999. J. Macher , Sc.D., M.P.H., Cincinnati, Ohio.
4. Atkins S.D., Clark I.M. Fungal molecular diagnostic; a mini review. *J. Appl. Genet.*, 2004 ; 45 (1): 3-15.
5. Aydogdu H., Asan A., Tatman Otkun M.: Indoor and outdoor airborne bacteria in child day-care centers in Edirne City (Turkey), seasonal distribution and influence of meteorological factors. *Environ Monit Assess.*, 2009, Apr. 29.
6. Basel T.L., Martin J.M., Carriker C.G., Wilson S.C., Straus D.C.: Detection of airborne *Stachybotrys chartarum* macrocyclic trichothecene mycotoxins in the indoor environment. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(11):7376-88.
7. Bianconi A., Guerrera E., Ruspolini F., Taglieri L.: Risk assessment in Umbria (Central Italy) sawmills. In: *Atti Congresso Internazionale Wood Dust.*: 81, Strasburgo , ottobre 2006.
8. Brisotto R.: Respiratori a filtro. Protezione da agenti biologici. *Tecnica Ospedaliera*, settembre 2008, pagg. 126-132.
9. British Standard, (BS) 5295. Environmental cleankiness in enclosed spaces, part 1-5, 1989.
10. Brunetti M., Fenoglietto M., Castrogiovanni G., Caroli D., Fontana: Indagini microbiologiche indoor: valutazione sulle metodologie di prelievo e di analisi dei dati., 2002. *Atti del 88 Convegno AIDII* , Corvara:119-123.
11. Cavallari E., de Lellis L., Stefanelli G.P., Lorenzini T.: Il rischio biologico nei laboratori biologici e chimici non sanitari, *G. Ital. Med. Lav. Erg.*, 2008; 30:1 22-32.
12. Cavallari E., de Lellis L., Stefanelli G.P., Lorenzini T.: Il rischio biologico nei laboratori biologici e chimici non sanitari, *G. Ital. Med. Lav. Erg.*, 2008; 30:1 22-32.
13. Chew G.L., Douwes J., Doekes G., Higgins K.M., Van Strien R., Spithoven J., Brunekreef B.: Fungal extracellular polysaccharides (1-3)- β -glucans and culturable fungi in repeated sampling of house dust. *Indoor Air*, 2001; 11 (3):171-178.
14. Conferenza Permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano. Accordo 27 settembre 2001 tra il Ministro della salute, le regioni e le province autonome sul documento concernente: Linee-guida per la tutela e la promozione della salute negli ambienti confinati (G.U. n. 276 del 27 novembre 2001, Suppl. Ord. N. 252).
15. Coordinamento Tecnico Interregionale della Prevenzione dei Luoghi di Lavoro, in

- collaborazione con ISPESL. Microclima, aerazione e illuminazione nei luoghi di lavoro. Linee Guida, 2006.
16. Cottica D., Grignani E.: I sistemi di campionamento per agenti chimici e biologici secondo le norme europee, 2000, I Congressi della Fondazione Maugeri, Vol. 4.
 17. Dacarro C., Grignani E., Lodola L., Grisoli P., Cottica D.: Proposta di indici microbiologici per la valutazione della qualità dell'aria degli edifici, *G. Ital. Med. Lav. Erg.*, 2000; 22 (3): 229-235.
 18. Decreto Legislativo 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 (G.U. n. 101 del 30 aprile 2008, Suppl. Ord. n. 108).
 19. Decreto Legislativo 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 (G.U. n. 101 del 30 aprile 2008, Suppl. Ord. n. 108).
 20. Ellringer P.J., Boone K., Hendrickson S.: Building material used in construction affect indoor fungal level greatly. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 2000; 61: 895-899.
 21. EN 149: 2001 Respiratory protective devices - Filtering half masks to protect against particles - requirements, testing, marking.
 22. EN 166: 2001 Personal eye-protection specification.
 23. EN 374: 2003 Protective gloves against chemicals and micro-organism. Part 1, 2, 3.
 24. EN 420: 2004 Protective gloves - General requirements and test methods.
 25. European Collaborative Action, Indoor Air Quality & Its Impact on Man, Report No. 12 Biological Particles in Indoor Environments, Commission of the European Communities EUR 14988 EN 1993.
 26. Federal Standard 209 D. Clean Room and Work Station requirements, controlled environment 1988.
 27. Fisher F., Cook N.B.: Fundamentals of diagnostic mycology. Philadelphia, WB Saunders Company, 1998.
 28. Giovinazzo R., Anzidei P., Calabrese P., Frusteri L., Guerrera E., Sarto D., Venanzetti F., Veltroni M.: Qualità della misura degli agenti biologici negli ambienti di lavoro: esperienza di intercalibrazione tra laboratori INAIL-CON-TARP. Atti del 26° Congresso Nazionale AIDII (comunicazione orale), Siena 25-27 giugno 2008, pagg. 87-96.
 29. Giovinazzo R., Anzidei P., Frusteri L., Guerrera E., Sarto D., Venanzetti F.: Biological risk assessment in workplaces: the Italian Workers' Compensation Authority Approach. 28th International Congress on Occupational health (ICOH), Milano 11-16 giugno 2006, p. 354.
 30. Giovinazzo R., Barca S., Calabrese P., Caradonna L., Caselli U., Giaquinta G., Guerrera E., Mameli M., Marena G., Mastromartino T., Sarto D., Summa F., Veltroni

- M.: Il monitoraggio microbiologico negli ambienti di lavoro: confronti interlaboratorio per la qualità del dato. Atti del 68° Seminario di aggiornamento dei professionisti CONTARP 'Sicurezza e prevenzione: esperienze a confronto', pagg. 201-208.
31. Giovinazzo R., Massera S., Incocciati E.: L'efficacia delle misure di agenti chimici e biologici aerodispersi negli ambienti di lavoro: il contributo dell'INAIL-CONTARP. *G. Ital. Med. Lav. Erg.* Volume XXIX N. 3, Luglio-settembre 2007, pagg. 732-733 (Atti del 70° Congresso Nazionale SIMLII, Roma 12-15 dicembre 2007).
 32. Grisoli P., Rodolfi M., Villani S., Grignani E., Cottica D., Berri A., Picco A.M., Dacarro C.: Assessment of airborne microorganism contamination in an industrial area characterized by an open composing facility and a wastewater treatment plant. *Environ. Res* 2009, 109 (2):135-42.
 33. Guerrera E., Guarrera O., Pitzurra L.: Fluidi lubrificanti e rischio microbiologico nel settore metalmeccanico: risultati preliminari. In: Atti del 6° seminario di aggiornamento dei professionisti CONTARP: 217-224. Varese 29 settembre-18 ottobre 2009.
 34. Guerrera E., Guarrera O., Pitzurra L.: L'autocontrollo microbiologico nel settore della seconda lavorazione del legno: risultati preliminari. In: Atti del 5° seminario di aggiornamento dei professionisti CONTARP: 137-148. Taormina 6-8 novembre 2007.
 35. Guerrera E., Sarto D., Mameli M.: L'applicazione degli indici microbiologici in varie realtà lavorative: una possibilità di confronto. In: Atti del 5° seminario di aggiornamento dei professionisti CONTARP: 149-156. Taormina 6-8 novembre 2007.
 36. Guerrera E., Frusteri L., Giovinazzo R., Mariani M., Pitzurra L.: Presenza del rischio microbiologico nel settore delle falegnamerie umbre. *G. Ital. Med. Lav. Erg.*, 2006;28:4: 466-471.
 37. Haistensen A.S., Nordby K.C., Wouters I.M., Eduard W.: Determinants of microbial exposure in grain farming. *Ann. Occup. Hyg* 2007;51(7):581-92.
 38. Harrison J., Pickering C.A., Faragher E.B., Austwick P.K., Little S.A., Lawton L.: An investigation of the relationship between microbial and particulate indoor air pollution and the sick building syndrome. *Resp. Med.*, 1992; 86: 225-235.
 39. Heidelberg J.F., Shahamat M., Levin M., Rahman I., Stelma G., Grim C., Colwell R.R.: Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microb.*, 1997; 63 (9): 3585-3588.
 40. INAIL: Linee guida ad uso interno. Allergeni indoor nella polvere degli uffici. Campionamento e analisi, 2003 (portale INAIL: www.inail.it - sicurezza sul lavoro/studi e ricerche/linee guida ad uso interno).
 41. INAIL: Linee guida ad uso interno. Il monitoraggio microbiologico negli ambienti di lavoro. Campionamento e analisi, 2005 (portale INAIL: www.inail.it - sicurezza sul lavoro/studi e ricerche/linee guida ad uso interno).

42. ISO 14644-1 Classification of Air Cleanliness (1999).
43. ISO 14698-1 Biocontamination Control - General Principles (2003).
44. ISO 14698-2 Biocontamination Control - Methodology for Measuring the efficiency of processes of cleaning and / or disinfection on inert surfaces bearing biocontaminated wet soiling or biofilms (1998).
45. ISO 7730:2006 - Ergonomia degli ambienti termici - Determinazione analitica e interpretazione del benessere termico mediante il calcolo degli indici PMV e PPD e dei criteri di benessere termico locale.
46. ISO 9920: 1995 "Ergonomics of thermal environment. Estimation of thermal insulation and evaporative resistance of a clothing ensemble".
47. ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
48. ISPESL - AIRESPPSA: Manuale di sicurezza nei laboratori. Edizione italiana, AIRESPPSA 2005.
49. ISPESL: Dipartimento Igiene del Lavoro, Dispense del corso di formazione "Il rischio da agenti biologici: rilevamento, valutazione e prevenzione", Roma 1-2 luglio 2004.
50. Iwen P.C.: Molecular detection and typing of fungal pathogens. Clin. Lab. Med., 2003; 23: 781-799.
51. Kern M.E., Blevins K.S.: Medical Mycology. A self instructional text. Philadelphia, F.A. Davis Company, Second edition 1997.
52. Konemann E.W.: Testo atlante di microbiologia diagnostica, 1995. Seconda Ediz., Antonio Delfino Editore, Roma.
53. Kryszyska -Traczyk E., Skorska C., Colewa G., Sitkowska J., Milanowsky J., Dutkiewicz J.: Exposure to airborne microorganisms in furniture factories. Ann. Agric. Environ. Med., 2001, 9: 85-90.
54. La Placa M.: Principi di microbiologia medica, Settima Ediz., Società Editrice Esculapio, Bologna 1995.
55. Ligugnana R.: Il controllo microbiologico ambientale. Note Applicative, 1999 Pbi international, Milano.
56. Lin X., Reponen T., Willeke K., Grinshpun S.A., Foarde K.K., Ensor D.S.: Long-term sampling of airborne bacteria and fungi into a non-evaporating-liquid- measurement of effective air-flow rate and collection efficiency. Atmospheric Environment, 1999; 33: 4291-4298.
57. Martin A.P.: Phylogenetic approaches for describing and comparing the diversity of microbial communities. Applied and environmental microbiology, 2002; 68 (8): 3673-3682.
58. Mc Grath J.J., Wong W.J., Cooley D., Straus D.C.: Continually measured fungal profile in sick building syndrome. Current Microbiology, 1999; 38:33-36.

59. Montacutelli R., Maggi O., Tarsitani G., Gabrielli N.: Aerobiological monitoring of the "Sistine Chapel": airborne bacteria and microfungi trends. *Agrobiologia*, 2000, 16(3-4); 441-448.
60. Nunes Z.G., Martins A.S., Altoe A.L.F., Nishikawa M.M., Leite M.O., Aguiar P.F., Fracalanza S.E.: Indoor air microbiological evaluation of offices, hospitals, industries and shopping centers. *Mem Inst OswaldoCruz*, Rio de Janeiro. 2005. 100(4): 351-357.
61. P.A. Jensen and M.P. Schafer: Sampling and characterization of bioaerosols, NIOSH Manual of Analytical Methods, 1/15/1998.
62. Pasquarella C., Pitzurra O., Savino A.: The index of microbial air contamination , 2000, *Journal of hospital infection*, 46:241-256.
63. Pitzurra M., Savino A., Pasquarella C.: Il Monitoraggio ambientale microbiologico (MAM),1997. *Ann.Ig.*,9:439-454.
64. Reponen T.A., Gazonko S.V., Grinshpun S.A., Willeke K., Cole E.C.: Characteristics of airborne actinomycete spores. *Applied and environmental microbiology*, 1998; 64 (10): 3807-3812.
65. Scheff P.A., Paulius V.K., Curtis L., Conroy L.M.: Indoor air quality in a middle school part II: Development of emission factors for particulate matter and bioaerosols. *Appl. Occup. Environ. Hyg.* 2000; 15: 835-842.
66. Seeley H.W. Jr., Vandemark P.J., Lee J.J.: *Microbes in action. A laboratory manual of microbiology*, Fourth Edition, 1997. W.H. Freeman and Company, New York.
67. UNI 10339:1995 Impianti aeraulici al fini di benessere. Generalità, classificazione e requisiti. Regole per la richiesta d'offerta, l'offerta, l'ordine e la fornitura.
68. UNI 11108:2004 Qualità dell'aria - Metodo di campionamento e conteggio dei granuli pollinici e delle spore fungine aerodisperse.
69. UNI EN 13098, "Linee guida per la misurazione di microorganismi e di endotossine aerodispersi", Luglio 2002.
70. UNI EN 14031:2005 Atmosfere nell'ambiente di lavoro - Determinazione di endotossine in sospensione nell'aria.
71. UNI EN 14042:2005 Guida all'applicazione e all'utilizzo di procedimenti per la valutazione dell'esposizione ad agenti chimici e biologici.
72. UNI EN 14583:2005 Atmosfere nell'ambiente di lavoro - Dispositivi di campionamento volumetrici di bioaerosol - Requisiti e metodi di prova.
73. UNI EN 27243-00:1996 Ambienti caldi. Valutazione dello stress termico per l'uomo negli ambienti di lavoro, basata sull'indice WBGT (temperatura a bulbo umido e del globotermometro).
74. UNI EN 374-1, 2, 3:2004 Protective gloves against chemicals and micro-organisms, Part 1, 2, 3.

75. UNI EN ISO 10551:2002 Ergonomia degli ambienti termici - Valutazione dell'influenza dell'ambiente termico mediante scale di giudizio soggettivo.
76. UNI EN ISO 13731-00:2004 Ergonomia degli ambienti termici - Vocabolario e simboli.
77. UNI EN ISO 7218:2007 Requisiti generali e guida per le analisi microbiologiche.
78. UNI EN ISO 7933:2005 Ergonomics of the thermal environment - Analytical determination and interpretation of heat stress using calculation of the predicted heat strain.
79. UNI EN ISO 8996:2005 Ergonomics - Determination of metabolic heat production.
80. UNI EN ISO 9920:2007 Ergonomics of the thermal environment - Estimation of the thermal insulation and evaporative resistance of a clothing ensemble.
81. UNI ENV ISO 11079:2008 Ergonomics of the thermal environment - Determination and interpretation of cold stress when using required clothing insulation (IREQ) and local cooling effects.
82. UNICHIM Metodo 1962-1:2006 Ambienti di lavoro. Determinazione della contaminazione microbiologica dell'aria mediante campionatore attivo per impatto su fluido.
83. UNICHIM Metodo n. 1962-2:2006 Ambienti di lavoro. Contaminazione microbiologica dell'aria (batteri e miceti). Determinazione mediante campionatore attivo per impatto ortogonale.
84. UNICHIM Metodo 1962-3:2006 Ambienti di Lavoro - Contaminazione microbiologica dell'aria (Batteri e miceti). Determinazione mediante campionatore attivo per filtrazione.
85. UNICHIM Metodo 1962-4:2006 Ambienti di Lavoro - Contaminazione microbiologica dell'aria (Batteri e miceti). Determinazione mediante campionatore attivo per impatto centrifugo.
86. Venanzetti F., Anzidei P., Guerrera E., Sarto D., Giovinazzo R.: Identificazione molecolare di miceti ambientali: un utile strumento per l'igiene occupazionale, Atti del IV Seminario CONTARP - Assisi, 22-24 novembre 2005, pag. 247-250.
87. Venanzetti F., Anzidei P., Giovinazzo R., Incocciati E., Panaro P., Piccioni R., Rughi D., Stefani G.: Occupational risk factors in wine cellars and oil mills of central Italy: a study case. 28th International Congress on Occupational Health (ICOH), Milano 11-16 giugno 2006, p. 300.
88. Venanzetti F., Giovinazzo R.: A qualitative approach to occupational bioaerosol monitoring: molecular identification of mycetes, 28th International Congress on Occupational Health (ICOH), Milano 11-16 giugno 2006, pag. 349.
89. World Health Organization (WHO). Guidelines for indoor air quality: dampness and mould, 2009.

Legionella e rischi igienici degli impianti aeraulici.

1. Accordo della Conferenza Permanente per i rapporti tra lo Stato, le Regioni e le Province autonome. Linee guida per la definizione di protocolli tecnici di manutenzione predittiva sugli impianti di climatizzazione (Suppl. Ord. G.U. n. 256 del 3 novembre del 2006).
2. AICARR: Associazione Italiana Condizionamento dell'Aria, Riscaldamento e Refrigerazione. Linee guida sulla manutenzione degli impianti di climatizzazione, Roma, 2005 (www.aicarr.org).
3. AIISA: Associazione Italiana Igienisti Sistemi Aeraulici. Procedure per la pulizia e la sanificazione dei sistemi aeraulici, Roma, 2005 (www.aiisa.it).
4. EWGLINET (European Surveillance Scheme for Travel Associated Legionnaires' Disease) - EWGLI (European Working Group for Legionella Infections). European Guidelines for Control and Prevention of Travel Associated Legionnaires' Disease, 2005 (<http://www.ewgli.org>).
5. Linee guida per la prevenzione ed il controllo della legionellosi (G.U. n. 103 del 5 maggio 2000).
6. Linee guida recanti indicazioni ai laboratori con attività di diagnosi microbiologica e controllo ambientale della legionellosi (G.U. n. 29 del 5 febbraio 2005).
7. Linee guida recanti indicazioni per gestori di strutture turistico-recettive e termali (G.U. n. 28 del 4 febbraio 2005).
8. Metodo UNICHIM N. 1037:2002 Acque destinate al consumo umano.
9. NADCA, National Air Duct Cleaners Association. Assessment, Cleaning and Restoration of HVAC Systems, Whashington D.C., 2006 (www.nadca.com).
10. Regione Emilia Romagna, Delibera di giunta n. 1115 del 21 luglio 2008. Approvazione linee guida regionali per la sorveglianza ed il controllo della legionellosi.
11. Regione Liguria. Disciplina per la costruzione, installazione, manutenzione e pulizia degli impianti aeraulici, Legge regionale n. 24 del 2 luglio 2002.
12. Regione Liguria. Regolamento di attuazione della legge regionale n. 24 del 2 luglio 2002, Decreto del Presidente della Giunta Regionale della Liguria n. 8/REG del 16 aprile 2003.
13. Regione Lombardia. Linee guida: prevenzione e controllo della legionellosi in Lombardia, Decreto n. 1751 del 24 febbraio 2009.
14. UNI ISO 11731-1:1998 Water quality - detection and enumeration of legionella.
15. UNI ISO 11731-2:2004 Water quality - detection and enumeration of legionella.

ALLEGATI

Allegato n. 1 - DISPOSITIVI DI PROTEZIONE INDIVIDUALI

Sia nelle attività di campionamento microbiologico sia durante le analisi di laboratorio, si può essere esposti a bioaerosol, schizzi di liquidi biologici, contatto con materiali potenzialmente infetti, per cui si rendono necessari dispositivi di protezione individuali (DPI) per mani, corpo, vie respiratorie e occhi.

CAMPIONAMENTO MICROBIOLOGICO

La scelta dei DPI da utilizzare dipende dall'ambiente di lavoro in cui si deve effettuare il campionamento.

Essi devono:

- avere almeno le medesime caratteristiche di quelli utilizzati dal personale che opera nel suddetto ambiente (esclusi naturalmente i DPI richiesti per le operazioni specifiche);
- assicurare un'adeguata protezione dai rischi dello specifico ambiente di lavoro.

A questo scopo potrebbe essere utile contattare il Datore di lavoro o un rappresentante del Servizio di Prevenzione e Protezione dell'azienda e consultare il documento di valutazione dei rischi.

a) Ambienti indoor non industriali

Non sono richiesti DPI specifici tranne casi particolari in cui possa esservi il rischio di esposizione a bioaerosol potenzialmente infetto (ad esempio torri di raffreddamento, impianti di climatizzazione, ecc.), nei quali vi è la necessità di DPI per le vie respiratorie.

È sempre, comunque, necessario usare guanti monouso per il campionamento e mascherine chirurgiche per non contaminare i terreni usati per il prelievo.

b) Ambienti industriali

Possono essere necessari:

- scarpe di sicurezza con suola antiscivolo, antiperforazione e puntale rinforzato;
- indumenti ad alta visibilità;
- casco;
- maschera antipolvere o facciale filtrante (provvisto di certificazione CE di Tipo per lo specifico rischio) o autorespiratore;
- tute monouso in tessuto non tessuto;

- cuffie per capelli, gambali, camici o copriscarpe monouso;
- cuffie e tappi auricolari;
- oltre all'impiego dei guanti durante il campionamento.

ATTIVITÀ DI LABORATORIO

Le attività svolte in laboratorio richiedono l'utilizzo dei seguenti DPI:

- guanti rispondenti alle norme tecniche EN 420 ed EN 374 (guanti in lattice, in nitrile per soggetti allergici, ecc.).
Devono essere disponibili anche guanti in gomma per il lavaggio degli strumenti e della vetreria di laboratorio.
- Occhiali protettivi (occhiali in policarbonato) e schermi facciali (visiera antiappannante), che l'operatore deve indossare per l'esecuzione di tutte le procedure e manovre che comportano un rischio di esposizione delle mucose orali, nasali e congiuntivali. Questi dispositivi devono poter garantire la protezione da gocce o spruzzi liquidi, come richiesto dalla norma EN 166. Il presidio di protezione facciale deve essere indossato anche in presenza di occhiali da vista;
- dispositivi per la protezione del corpo conformi alla norma EN 14126, di diversa tipologia (tuta, camice) in relazione alle modalità lavorative ed alle mansioni da espletare;
- DPI delle vie respiratorie, la cui scelta dipende essenzialmente dalla dimensione delle particelle infettanti aerodisperse e dalle caratteristiche dell'agente biologico. Devono essere conformi alla norma tecnica EN 149. Possono essere necessari facciali filtranti provvisti di certificazione CE di Tipo.

PER UN CORRETTO USO DEI GUANTI

- lavare e asciugare le mani prima di indossare qualsiasi tipo di guanto;
- indossare i guanti immediatamente prima di eseguire le procedure a rischio e rimuoverli al termine;
- lavare sempre le mani dopo la rimozione dei guanti;
- evitare quando possibile l'utilizzo continuativo dello stesso paio di guanti (cambiarli ogni 30 minuti);
- utilizzare il guanto adeguato alla procedura da espletare;
- utilizzare il guanto della misura giusta.

Dato che l'efficacia dei guanti diminuisce se indossati per procedure di lunga durata, si consiglia di provvedere regolarmente a sostituirli.

Allegato n. 2 - PREPARAZIONE DEI TERRENI

- Utilizzare recipienti autoclavabili di volume all'incirca doppio rispetto al volume di terreno da preparare: nel caso in cui debbano essere preparati più terreni diversi, identificare opportunamente ogni contenitore con la sigla del relativo terreno
- Pesare su bilancia tecnica le quantità di terreno in polvere necessaria (attenzione: effettuare se possibile tale operazione in sicurezza, perché alcuni terreni si disperdono facilmente nell'aria e possono irritare le mucose)
- Immettere una aliquota del volume totale di acqua distillata da utilizzare per sciogliere il terreno, aggiungere il terreno disidratato e portare a volume con la restante acqua distillata
- Tappare il recipiente senza serrarne il coperchio e agitarne manualmente il contenuto
- Posizionare il recipiente su un agitatore magnetico riscaldante, inserendovi il magnetino
- Avviare l'agitazione (a velocità sufficiente a creare vortice non troppo violento) e il riscaldamento della piastra magnetica (a temperatura idonea alla solubilizzazione del terreno nell'acqua distillata)
- Quando il terreno in polvere si è adeguatamente sciolto, spegnere l'agitatore, apporre sul contenitore una striscia di nastro da autoclave, per la verifica della corretta sterilizzazione, e autoclavare a 121°C per 15-20 min
- Al termine della sterilizzazione, lasciare raffreddare il terreno in autoclave fino a **45°C circa** prima di estrarre il recipiente e trasferirlo sotto cappa
- A questo punto si possono aggiungere eventuali supplementi al terreno (antibiotici etc.), secondo quanto richiesto dalla formulazione
- Svitare il tappo del contenitore poggiandolo in posizione rovesciata sul ripiano della cappa e procedere al riempimento delle piastre
- Una volta ultimata l'operazione, sciacquare sotto acqua corrente il recipiente e il coperchio (interno ed esterno), per rimuovere i residui di terreno. Effettuare l'ultimo lavaggio con acqua distillata.

Per i terreni non autoclavabili portare ad ebollizione la soluzione su bunsen, piastra o forno a microonde: la soluzione va agitata di tanto in tanto e l'ebollizione va interrotta immediatamente, rimuovendo il contenitore dalla fonte di calore.

Nel caso di preparazione di terreni solidi, questa operazione va ripetuta di nuovo fino a che il terreno non è completamente limpido.

Allegato n. 3 - PREPARAZIONE DELLE PIASTRE

- Effettuare tale operazione in condizioni di sterilità (sotto cabina di sicurezza biologica, indossando guanti e camice)
- Rispettare i volumi di riempimento indicati dalle Ditte produttrici delle piastre sterili. Se si formano bolle sulla superficie dell'agar rimuoverle o tramite pipetta aspiratrice o bucadole con un puntale sterile.
- **Non chiudere le piastre appena riempite, quando il terreno è ancora caldo:** lasciare solidificare e raffreddare completamente il terreno sotto flusso laminare per almeno 30 min. (ciò consente di evitare la formazione di fastidiose condense)
- Una volta raffreddatosi il terreno, chiudere le piastre con i rispettivi coperchi, impilarle capovolte in appositi contenitori rigidi - diversi a seconda delle finalità di impiego (campionamento attivo, passivo o di superficie) e del tipo di terreno - per evitarne il rovesciamento e l'apertura durante la manipolazione e il trasporto
- Sigillare con parafilm i contenitori ed identificarli con apposita etichetta (in cui riportare: data di produzione e sigla del terreno di coltura)
- Se non utilizzate immediatamente, stoccare le piastre a +4°C. Si consiglia comunque, di preparare le piastre in prossimità del campionamento.
- Prima dell'utilizzo, trasportare le piastre dal frigo alla cappa, disinfettando le superfici dei contenitori e testare la sterilità di alcune piastre scelte a campione. Aprire le confezioni solo sotto cappa.
- Procedere all'identificazione inequivocabile e leggibile delle piastre, sovrascrivendo con pennarello indelebile, secondo il seguente codice identificativo:
sigla del terreno di coltura con cui sono riempite (v. tabella II), seguita dal numero corrispondente a quello con cui è stato denominato il punto di prelievo per il quale la piastra verrà utilizzata; i replicati verranno indicati dalle lettere "a, b, c". Per diversificare le piastre da utilizzare per la valutazione della carica psicofila, rispetto a quelle per la mesofila, far seguire il numero dalla sigla "**22°C**". Per diversificare le piastre da 55-60 mm di diametro da utilizzare per i campionamenti di superficie da quelle per i campionamenti attivi, apporre con la punta piatta di un pennarello nero, lungo i due lati opposti di esse, **due linee parallele** (figura 6).

Figura 6 - Marcatura delle piastre per il campionamento di superfici



- Sotto cappa i tappi dei recipienti, le piastre e i relativi coperchi vanno posizionati con la parte concava verso l'alto
- Evitare di toccare con le mani o con i polsini del camice i materiali e gli oggetti posti sotto cappa
- Per ottimizzare lo svolgimento delle operazioni attenersi alle seguenti istruzioni generali: disporre le piastre da riempire in serie sul lato sinistro del ripiano e cominciare a riempirle partendo da quelle più esterne verso le interne, utilizzando una pipetta graduata (di volume idoneo a riempire la piastra tramite un solo prelievo di terreno, onde limitare l'errore) e un pipettatore automatico (attenzione: alcuni terreni hanno densità tale da favorirne lo sgocciolamento fuori dalla pipetta durante le operazioni di riempimento piastre).
- Terminate le operazioni sgombrare il ripiano della cappa e pulirlo, rimuovendo attentamente eventuali residui di terreno, prima con acqua distillata e poi con soluzione disinfettante alcoolica sterile, asciugando ogni volta.
- Procedere infine ad un ciclo di sterilizzazione del ripiano tramite lampade UV, per una durata di almeno 30 minuti.

Allegato n. 4 - SCHEDA DI INDAGINE MICROBIOLOGICA

Azienda prog./pratica

Settore di attività _____ Data _____

Esposizione ad agenti biologici: ☐ potenziale ☐ accidentale ☐ impiego deliberato

Tecnico/Professionista _____

Descrizione del ciclo produttivo

Materie prime

Caratteristiche dell'azienda

n. ambienti

condizionamento ☐ SI ☐ NO

fasi del ciclo compartimentate ☐ SI ☐ NO

Macchinari e/o impianti

Organizzazione del lavoro

orario di lavoro

personale numero

mansioni

Valutazione del rischio biologico ☐ SI ☐ NO

Note

Allegato n. 5 - SCHEDA CAMPIONAMENTO MICROBIOLOGICO - CARICA ESTERNA

Azienda prog./pratica

Data ora prelievo

Condizioni ambientali

temperatura umidità

tempo Pioggia Nuvoloso Nebbia Parzialmente nuvoloso Sereno

velocità dell'aria

direzione vento

Note

Posizione del campionatore rispetto all'azienda

Distanza a Nord Est Sud Ovest

Sotto vento id. piastre

Sopra vento id. piastre

Allegato n. 6 - SCHEDA CAMPIONAMENTO MICROBIOLOGICO

Azienda prog./pratica

Data ora prelievo

Ambiente campionato

Locale ad uso

numero di finestre dimensioni ambiente < 30 m² > 30 m²

condizionamento NOSI

personale presente NOSI se SI quante persone

attività in corso NOSI se NO Prima del turnoDopo il turno

Note

Punti di rilievo

Centro ambienteDiagonale Id punto/i

terreni TSASABMSA altro

Note

Bocchetta/e aria Id punto/i

terreni TSASABMSA altro

Note

Superfici	Id punto/i		descrizione	
	terreni	TSA	SAB	altro

Note



Campionatore _____

portata l/min		Volume d'aria campionato	
---------------	--	--------------------------	--

Note

Allegato n. 7 - RISULTATI CAMPIONAMENTO MICROBIOLOGICO

Azienda prog./pratica

Data id. punto/i

Locale ad uso

Bioaerosol

Parametro	UFC/m ³
Carica batterica psicrofila	
Carica batterica mesofila	
Carica fungina totale	
stafilococchi	
enterobatteri	

Identificazione *

Batteri

Funghi

Superfici

Parametro	UFC/100cm ³
Carica batterica psicrofila	
Carica batterica mesofila	
Carica fungina totale	
stafilococchi	
enterobatteri	

Identificazione *

Batteri

Funghi

Parametri microclimatici

Temperatura aria (°C)	
Umidità relativa	
Velocità dell'aria	

* Nel caso di invio del campione si consiglia di allegare una breve descrizione della morfologia della colonia e del metodo identificativo utilizzato

Allegato n. 8 - INDICAZIONI IN CASO DI INCIDENTI O EMERGENZE

Durante un'attività lavorativa in laboratorio si possono verificare diversi incidenti tra cui i principali sono i seguenti:

- spargimento di materiale biologico sulle superfici;
- punture, tagli, abrasioni con materiale potenzialmente infetto;
- esposizione a bioaerosol;
- rottura di provette in centrifuga.

Ogni laboratorio deve disporre di adeguate procedure di emergenza da adottare per la gestione degli incidenti sul lavoro.

SPARGIMENTO DI MATERIALE BIOLOGICO SULLE SUPERFICI

Lo spargimento di materiale biologico sulle superfici rappresenta uno dei più frequenti incidenti di laboratorio. È indispensabile un intervento di bonifica immediato, che può essere differenziato in relazione al livello di biosicurezza presente nel laboratorio. In caso di esposizione ad agenti biologici del gruppo 2, è necessario:

- avvisare le altre persone presenti nel laboratorio;
- lasciare la stanza chiudendo la porta;
- attendere almeno 30 minuti prima di poter rientrare nel laboratorio (questo periodo di tempo è necessario al fine di permettere la deposizione di un eventuale aerosol formatosi durante l'incidente);
- affiggere un apposito segnale di contaminazione biologica;
- togliersi gli indumenti eventualmente contaminati e lavare la cute esposta con sapone disinfettante;
- indossare un facciale filtrante con certificazione CE di Tipo, occhiali e guanti di gomma;
- coprire con carta assorbente un'area più ampia di quella contaminata;
- versare un disinfettante (per esempio ipoclorito di sodio al 10% o composto iodoforo);
- lasciare agire per circa 15 minuti;
- asportare con pinze e guanti il materiale trattato ed eliminarlo come rifiuto ospedaliero trattato;
- lavare con un comune detergente;
- sciacquare;
- disinfettare di nuovo;
- se le superfici sono verticali, pulirle con spugne imbevute di disinfettante, applicare un foglio di carta assorbente con nastri adesivi e imbibire con disinfettante la carta;

- decontaminare (preferibilmente in autoclave) il materiale riutilizzabile (per es. pinze metalliche);
- lavarsi le mani con sapone disinfettante.

Versamento di materiale biologico nella cappa

- Non spegnere la cappa.
- Rimuovere il materiale con carta assorbente imbevuta di disinfettante.
- Disinfettare pareti, superfici e strumenti sotto cappa.
- Una volta disinfettato, lasciare la cappa accesa per almeno altri 20 minuti.

In caso di contaminazione delle micropipette con liquidi potenzialmente infetti o colture batteriche, sterilizzare in autoclave a 121°C per 20 minuti (se le pipette sono autoclavabili).

Se contaminata con acidi nucleici, smontare la micropipetta ed immergere le parti in una soluzione di cloroformio per 10 minuti; risciacquare con acqua distillata ed asciugare.

PUNTURE, TAGLI, ABRASIONI CON MATERIALE POTENZIALMENTE INFETTO

Qualsiasi ferita, lesione cutanea, contatto accidentale con materiale potenzialmente infetto, va immediatamente comunicata ai soggetti individuati da apposita procedura di gestione degli infortuni.

Ferita da taglio o puntura accidentale

- Lavare abbondantemente l'area interessata con sapone liquido
- Favorire l'uscita di sangue dalla ferita
- Disinfettare la ferita con soluzione acquosa a base di iodio o cloro
- Chiedere immediatamente l'assistenza medica o avviare l'infortunato al pronto soccorso
- Conservare il campione biologico potenzialmente infettante.

Schizzo endoculare

- Lavare gli occhi abbondantemente mediante l'utilizzo degli appositi dispositivi lavaocchi
- Avviare l'infortunato al pronto soccorso
- Conservare il campione biologico potenzialmente infettante.

FUORIUSCITA ACCIDENTALE DI AEROSOL POTENZIALMENTE INFETTO

In caso di esposizione ad un aerosol biologico occorre:

- abbandonare immediatamente il laboratorio, avendo cura di chiudere la porta e di avvisare le altre persone presenti nel laboratorio;
- rimuovere attentamente il camice protettivo e riporlo in un sacco idoneo a contenere materiale infetto e resistente alle procedure di sterilizzazione in autoclave;
- lavarsi le mani e la cute esposta con acqua e sapone disinfettante;
- affiggere un apposito segnale di contaminazione biologica ed assicurarsi che il laboratorio sia evacuato per almeno 30 minuti (tale periodo è necessario affinché l'aerosol si depositi);
- chiudere le porte ed attivare gli UV;
- segnalare l'incidente al Responsabile del laboratorio;
- chiedere immediatamente l'assistenza medica per i soggetti esposti.

PROCEDURE IN CASO DI ROTTURA DI PROVETTA IN CENTRIFUGA

- Nel caso di rottura di una provetta contenente materiale infetto o potenzialmente infetto, è opportuno lasciare la centrifuga chiusa e spenta per circa 30 minuti per permettere la deposizione degli aerosol;
- apporre un cartello di avviso dell'avvenuta rottura;
- aprire la centrifuga provvisti di una mascherina (facciali filtranti con certificazione CE di Tipo), occhiali e guanti di gomma;
- prelevare il carrello e portarlo sotto cappa per la rimozione dei frammenti della provetta con pinze;
- eliminare i frammenti come rifiuto speciale;
- assorbire il materiale versato con carta assorbente, che dovrà essere eliminata come rifiuto speciale;
- trattare le parti fisse della centrifuga con disinfettante non corrosivo, lasciandolo agire per 20 minuti;
- procedere ad assorbire il disinfettante con carta assorbente;
- pulire con un detergente;
- risciacquare;
- disinfettare una seconda volta.

OGNI CONTAMINAZIONE ACCIDENTALE DELL'AMBIENTE E DEL PERSONALE DEVE ESSERE OPPORTUNAMENTE SEGNALATA.

Atlante fotografico

Interpretazione delle piastre secondo il protocollo CONTARP

PIASTRE LEGGIBILI, UFC NUMERABILI



Sabouraud + Cloramfenicolo

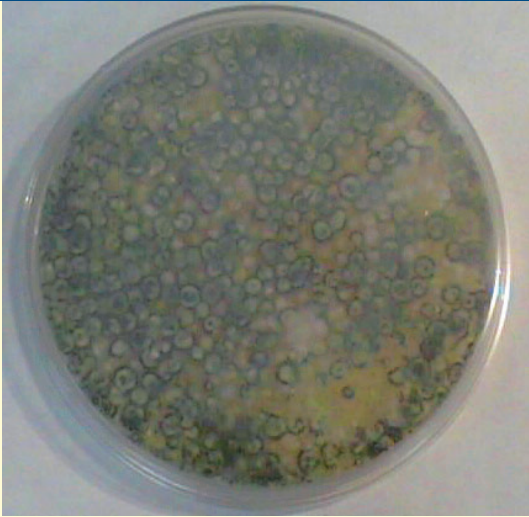


PCA

PIASTRE LEGGIBILI, UFC NUMERABILI PER LETTURA DI UN QUADRANTE

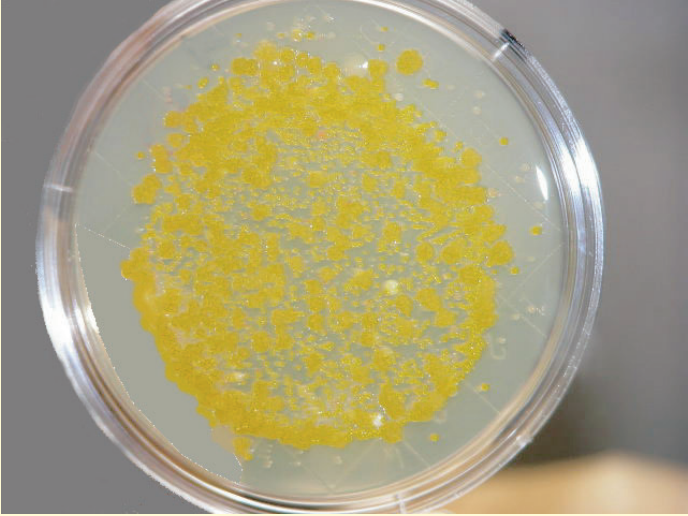


PCA

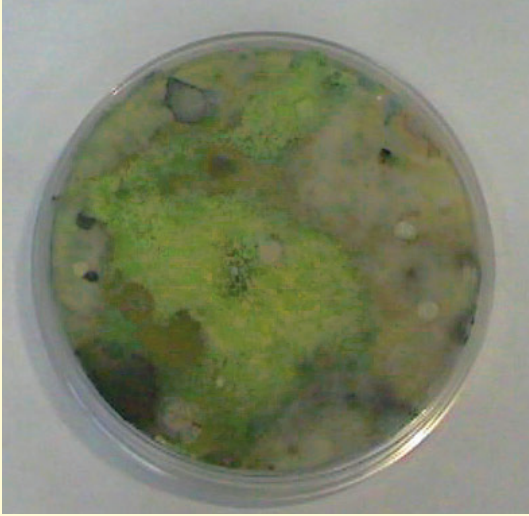


Sabouraud + Cloramfenicolo

PIASTRE NON LEGGIBILI, UFC NON NUMERABILI



PCA



Sabouraud + Cloramfenicolo

PATINA



PCA

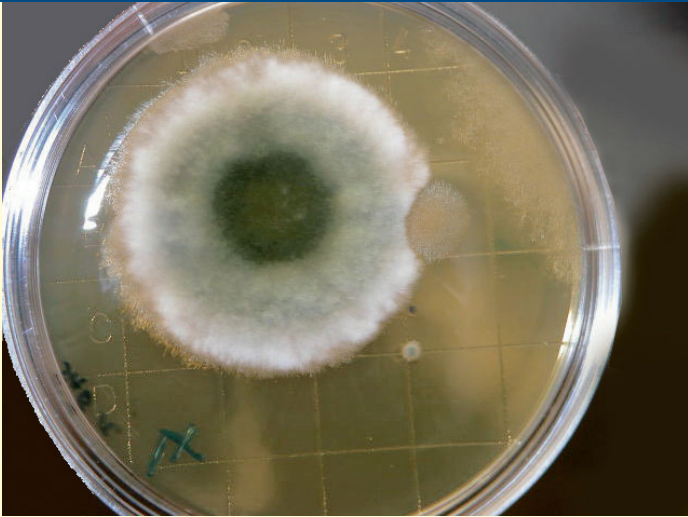


Sabouraud + Cloramfenicolo

CORONA



PCA



Sabouraud + Cloramfenicolo

Morfologia delle colonie

VELLUTATA



Sabouraud + Cloramfenicolo

POLVEROSA



Sabouraud + Cloramfenicolo

RUGOSA



Sabouraud + Cloramfenicolo



TSA

LANOSA



Sabouraud + Cloramfenicolo

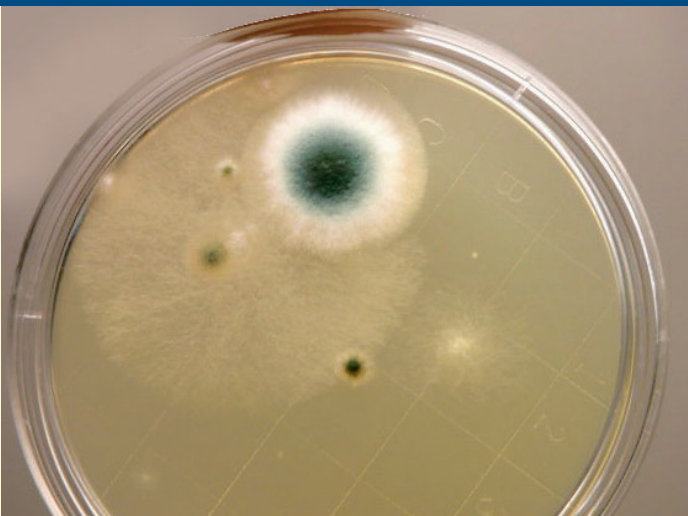


Sabouraud + Cloramfenicolo

COTONOSA



Sabouraud + Cloramfenicolo



Sabouraud + Cloramfenicolo

FELTRO



Sabouraud + Cloramfenicolo



Sabouraud + Cloramfenicolo

