

## CAPITOLO 4

### IL CAMPIONAMENTO AEROBIOLOGICO

**Renato Ariano, Andrea Fiorina**

**Unità Operativa Complessa di Medicina Interna  
A.S.L. n. 1 Imperiese – Ospedale “Saint Charles” di Bordighera**

**Servizio Pneumologico Territoriale - A.S.L. n. 2 Savonese  
Ambulatorio Pneumologico**

Il campionamento dell'aerosol biologico può essere effettuato per numerosi e diversi scopi scientifici (epidemiologico, tossicologico, botanico, fitopatologico, medico legale, allergologico, ecc.); prima di iniziare il campionamento è importante stabilire l'obiettivo di ricerca che si vuole ottenere che varierà, secondo le particelle che andiamo a ricercare (pollini, spore miceti, particelle inorganiche, organiche, ecc.), e dell'utilizzo che s'intende fare dei dati ottenuti (ricerca pura, correlazione causa effetto ambiente-paziente, ecc.), se la ricerca è effettuata indoor o outdoor, se s'intende effettuare un campionamento personale.

Nella nostra trattazione ci occuperemo soprattutto dei risvolti allergologici del campionamento aerobiologico.

Schematicamente si possono distinguere due tipi di lettura di un campionamento aerobiologico:

- di tipo **qualitativo**, in altre parole volto ad identificare il tipo di particella,
- di tipo **quantitativo**, indirizzato a misurare le variazioni di concentrazione atmosferica di quella determinata particella (1).

E' sempre molto importante scegliere l'apparecchiatura di campionamento più adeguata (2).

Esistono poi due tipi fondamentali di campionamento:

- **passivo (sedimentazione e impatto diretto)**
- **attivo (volumetrico).**

Nel primo le particelle sono raccolte per deposizione su di una superficie di campionamento perciò la misurazione è espressa per n° di particelle per unità di superficie, ad es. per metro quadrato.

Nel secondo le particelle sono raccolte tramite aspirazione e la misura è espressa in numero di particelle per metro cubo d'aria aspirata.

Le particelle vitali devono invece essere raccolte su di un terreno di coltura idoneo al loro sviluppo. A questo proposito s'impiegano delle apparecchiature che consentono la filtrazione o la raccolta in un liquido (metodo impinger) delle particelle per poi trasferirle su di un terreno di coltura.

#### **Il campionamento aerobiologico locale, microambientale e personale.**

Il campionamento aerobiologico può avvenire:

- a livello locale mettendo come descritto in precedenza il campionatore in posizione fissa in luoghi elevati, questo campionamento evidenzia una situazione ambientale regionale, generale, consente di stilare dei bollettini aerobiologici locali e con il tempo di effettuare delle previsioni correlando le letture con la situazione meteorologica locale.
- a livello microambientale mettendo i campionatori in luoghi ben determinati ad es. indoor o in luoghi particolari per valutare la situazione aerobiologica a livello locale, ambientale ad esempio per una valutazione di quartiere, di rapporto causa effetto tra allergene e paziente atopico
- a livello personale, utilizzando apposti campionatori leggeri, portatili è possibile oggi campionare a circa 10-15 cm dal naso o dalla bocca del paziente con le stesse caratteristiche della sua respirazione le particelle che potrebbe inalare e che potrebbero essere la causa della sua patologia

allergica (rinite, congiuntivite, asma) correlandole direttamente oltre che con la tipologia delle medesime anche con la valutazione quantitativa.

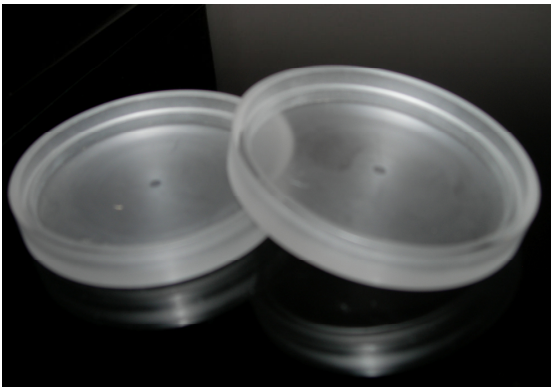
La scelta del tipo di campionamento più idoneo è importante, al fine di non sovrastimare o sottostimare i dati del campionamento, ma di cercare di ottenere i valori più vicini a quelli reali ambientali per i fini del nostro studio.

Importanti infine sono la scelta del luogo dove porre il campionatore, il tempo del campionamento, il numero di campioni da effettuare, la valutazione delle eventuali variazioni ambientali durante il campionamento, le tecniche utilizzate per l'identificazione e la conta del materiale isolato.

Ai fini allergologici, vi sono alcuni metodi per il campionamento di pollini e di spore fungine; le apparecchiature impiegate si basano su tre differenti principi: gravimetrico, per impatto e volumetrico.

### **METODO GRAVIMETRICO (o per sedimentazione)**

Questo metodo utilizza la sedimentazione per gravità, perciò le particelle da campionare si depositano direttamente su di una superficie orizzontale resa adesiva per intrappolare le particelle che vi si depositano. Fornisce il numero di particelle depositate per unità di superficie. Le capsule di Petri, contenenti terreni di coltura, sono spesso usate come campionatori gravitazionali.

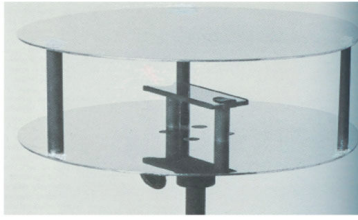


**Fig. 1 - Capsule di Petri usate come campionatori gravitazionali**

Le prime esperienze di campionamento con questo metodo furono fatte da Blakley nel 1873 (3). Questo metodo fu poi riproposto da Durham, nel 1946 (4), impiegando dei vetrini su cui era stata spalmata una soluzione glicerinata (la formula di preparazione è la seguente: 5 g gelatina, 40 ml d'acqua, 4 g di fenolo con 195 g di glicerina).

I vetrini sono esposti per 24 ore e la lettura è effettuata al microscopio ottico. Ancora oggi questo metodo assai semplice, di basso costo è talvolta utilizzato, per alcuni tipi di campionamento pur con le seguenti limitazioni: con l'apparecchio di Durham non è possibile valutare il volume d'aria campionato o calcolare la concentrazione nell'aria delle particelle campionate. Un altro limite di questo campionatore è che secondo la direzione del vento, rispetto all'asse del vetrino, il campionamento può essere più o meno ricco di particelle. Questo rende difficile un confronto tra diverse stazioni di campionamento, anche negli stessi periodi di tempo. Il campionamento per gravitazione, inoltre, avvantaggia i pollini e le spore più grandi a danno delle particelle più piccole che possono essere così sottostimate.

Un altro apparecchio utilizzato è quello di Tauber(5) che è costituito da un recipiente cilindrico con un'apertura per la cattura delle particelle, si usa una sostanza conservante così l'esposizione può durare lunghi periodi di tempo, sino ad alcuni mesi.



**Fig. 2 – Apparecchio di Durham**

### **METODO PER IMPATTO NON VOLUMETRICO**

Queste apparecchiature sfruttano i meccanismi fisici dell'inerzia delle particelle disperse in atmosfera. Quando le particelle si avvicinano ad un ostacolo le molecole d'aria che si trovano vicino divergono mentre la particella continua la sua corsa impattando sull'ostacolo. La superficie di campionamento è rivestita di materiale adesivo, per trattenere le particelle e poterle identificare in un tempo successivo.

La Cour trap è un'apparecchiatura che consiste in due filtri di garza imbevuti di silicone liquido. I filtri sono in posizione verticale e tenuti sempre contro vento grazie ad un apposito timone girevole. Affiancando a questo apparecchio un anemometro si può determinare la quantità teorica di aria che ha impattato sulle garze, nel periodo di tempo considerato.

Un altro campionatore appartenente a questa categoria di apparecchi è il Rotorod-Sampler, l'unico attualmente utilizzato seppur raramente (6). Questo campionatore utilizza, all'estremità di una struttura ad U, due bacchette su cui è spalmata una sostanza adesiva (in genere silicone liquido). Le due braccia ruotano vorticosamente attorno al loro asse di simmetria (a circa 1.500 rotazioni per minuto) di modo che le particelle aerotrasportate impattino contro le superfici e vi restino adese. Si possono utilizzare anche due vetrini portaoggetti (Rotoslide-Sampler) o due strisce di plastica (Rotobar-Sampler). In questi casi l'efficienza del campionamento cresce con le dimensioni delle particelle.



**Fig. 3 - Spore trap Rotorod  
University of Greenwich**

### **METODO VOLUMETRICO (ovvero impatto per depressione)**

E' il metodo oggi maggiormente utilizzato per indagini aerobiologiche di tipo qualitativo e quantitativo su spore fungine e granuli pollinici. Si fonda sulla possibilità di catturare particelle aerodisperse, componenti dell'aerosol biologico, utilizzando il principio dell'impatto per

depressione. Una pompa ad alimentazione elettrica, collocata nella parte inferiore dell'apparecchiatura, permette di produrre il vuoto al suo interno. In altri termini la pompa aspirante determina la suzione di un volume noto d'aria attraverso una fenditura di dimensioni note e fisse. L'apparecchio classico che sfrutta questa metodica è quello elaborato nel 1952 da Hirst (7), dal modello originario del quale sono stati, in seguito, costruiti i campionatori attualmente più diffusi ovvero il Burkard Spore Trap, il VPPS 2000 Lanzoni.



**FIGURA 4 - Spore trap volumetrico modello Burkard situato a Sanremo**



**FIGURA 5 – Spore trap volumetrico Modello Lanzoni situato a Bordighera.**

Questi apparecchi sono costruiti in metallo leggero trattato in modo da prevenire la corrosione da agenti esterni.

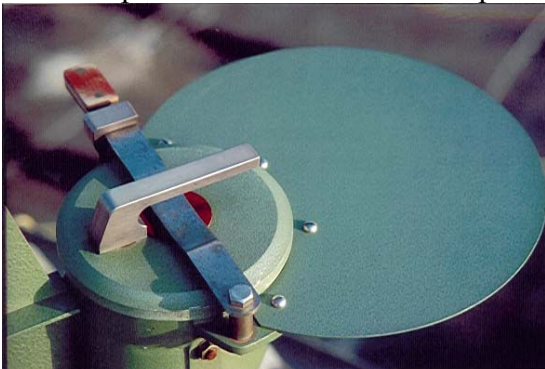
L'aspirazione dell'aria è effettuata tramite una pompa, la quale ha una forza aspirante di circa 10 litri il minuto, pari a 0,6 m<sup>3</sup> ogni ora, attraverso una fenditura di 2 x 14 mm<sup>2</sup> orientata sempre contro vento grazie all'azione di un alettone verticale che fa girare l'apparecchio sul suo asse.

Il volume d'aria campionato in 24 ore è di  $0,6 \times 24 = 14,4$  m<sup>3</sup>. L'apparecchiatura capta generalmente particelle provenienti da un'area circolare di circa 10 km se il territorio circostante è pianeggiante. L'aria aspirata è veicolata su di un tamburo di 345 mm di circonferenza mosso da un sistema interno ad orologeria che ruota alla velocità di 2 mm/ora e che ha un'autonomia di sette giorni. In tale maniera il tamburo compie una rotazione completa nell'arco di una settimana.



**Fig. 6 – Fenditura di aspirazione**

In realtà, alla fine dei sette giorni residuano 9 mm di nastro non esposto, pari ad un intervallo di 4 ore e 30 minuti, prima che i reperti catturati si sovrappongano se il nastro non è sostituito in tempo. Sul tamburo, che scorre in prossimità della fenditura, è distesa una striscia di plastica trasparente (nastro melinex 200) ricoperta di materiale adesivo adatto alla cattura delle particelle aerodisperse. L'apparecchio è riparato dalla pioggia e dal vento in quanto è chiuso da ogni lato. In caso di forte vento e/o pioggia, per evitare che possa filtrare acqua all'interno, è sufficiente stendere un strato sottile di pasta al silicone sull'orlo superiore del corpo dell'apparecchio.



**Fig. 7 – Coperchio di chiusura**

Al termine della settimana il tamburo è accuratamente rimosso ed il nastro adesivo, sollevato dal tamburo con le pinzette, è disteso sulla striscia di plexiglas provvista di divisioni trasversali giornaliere per poter essere tagliato in segmenti di 48 mm l'uno, corrispondenti ai giorni di campionamento. Nel rimontare il tamburo, dopo averlo caricato con una nuova striscia adesiva ed aver avvitato il dado in ottone del complesso ad orologeria, occorre controllare che l'inizio del nastro si trovi in corrispondenza della fenditura esterna.



**Fig.8 – Modalità di apertura**

L'esatta posizione dell'apparecchio è segnalata da apposite incisioni colorate sul tamburo. E' importante ricordare che l'orologio va caricato in senso antiorario. Ogni volta che si cambia il nastro bisogna ispezionare la fenditura in modo da assicurarsi della sua pervietà. L'efficienza del campionatore raggiunge valori inferiori al 100%, che variano con la velocità del vento e con la grandezza delle particelle. Nell'impossibilità di tarare l'apparecchio paragonandone l'efficienza con quella dei "tunnel del vento", occorre almeno controllare periodicamente la regolarità del flusso d'aria con un adatto flussimetro. E' pure molto importante verificare che il campionatore sia tarato correttamente e cioè che la distanza fra l'interno della fessura ed il tamburo sia di 0,5 mm. Può capitare infatti che durante il trasporto o al momento di smontarlo per il rimessaggio invernale, un allentamento delle viti causi una variazione di questo valore.



**Fig. 9 – Estrazione del tamburo.**

E' molto utile collocare accanto al campionatore un'apparecchiatura per la registrazione dei dati meteorologici come la temperatura, umidità, precipitazioni di pioggia misurati in mm, direzione e velocità del vento. In caso non si disponga di queste apparecchiature è opportuno richiederli alla più vicina stazione meteorologica territoriale.



**Fig 10 – Cambio dei tamburi.**

L'apparecchio tipo Hirst esiste sia nel modello a conta settimanale, sia nel modello a campionamento giornaliero. In questo caso, all'interno del contenitore c'è una slitta, in cui è posto un vetrino che si muove ad una velocità di 2 mm l'ora. Questo vetrino deve essere sostituito ogni 24 ore.



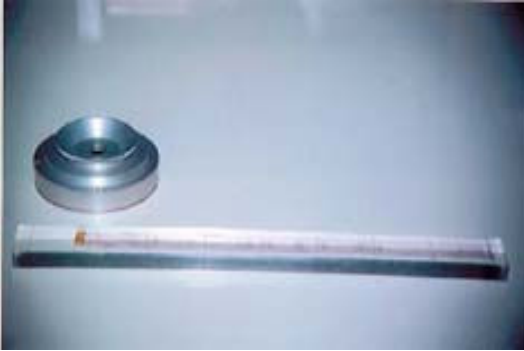
**Fig 11 – Tamburo da allestire.**

### **SCELTA DEL POSTO OVE INSTALLARE IL CAMPIONATORE**

La scelta del punto in cui installare il campionatore tipo Hirst è molto delicata. Occorre sempre tener conto del fatto che il campionatore volumetrico è sempre alimentato dalla corrente elettrica (dalla rete elettrica urbana o da pannelli solari fotovoltaici) e viene fissato al supporto, pertanto resterà fisso per tutto il periodo del campionamento. Per avere una visione generale della situazione aerobiologica l'apparecchio non deve essere installato troppo in alto, in zone atmosferiche dove predominano i granuli pollinici provenienti dagli alberi, ma nemmeno troppo in basso, dove si rischierebbe di captare soprattutto i granuli pollinici provenienti dalle erbe. Viene indicata come ottimale l'altezza dal suolo di 20 metri che permette al campionatore di restare nell'ambito degli strati turbolenti dell'atmosfera. E' consigliabile che l'apparecchio sia posto lontano da parchi o da boschi, in modo da evitare di captare i pollini soprattutto da queste aree, sovrastimando la presenza di determinati pollini, provenienti da queste sorgenti. E' anche consigliato di mantenere il campionatore lontano da fonti inquinanti, come ciminiere e camini. In questo caso il vetrino campionatore potrebbe essere costantemente ricoperto di polveri sottili provenienti da queste fonti. Inoltre il campionatore non dovrebbe essere sistemato su balconi chiusi da uno a più lati, per l'ovvio motivo che si perderebbe una significativa percentuale di campionamento dovuta alle barriere architettoniche interposte.

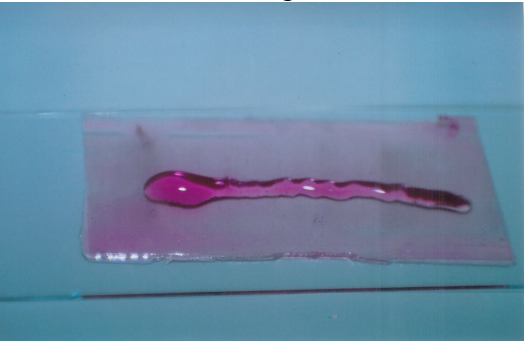
### **PREPARAZIONE DELLA SUPERFICIE DI CAMPIONAMENTO**

Per la cattura delle particelle aerotrasportate si utilizza una soluzione di olio di silicone in tetracloruro di carbonio. Questo tipo di adesivo può essere usato sia per il vetrino del metodo gravimetrico o volumetrico sia per la striscia a conta settimanale del campionatore volumetrico. Se si usa il campionatore giornaliero, si copre con un vetrino da microscopio, etichettato con la data di rilevamento, con un lieve strato di silicone strisciandolo con il bordo di un altro vetrino.



**Fig. 12 – Preparazione del nastro.**

Per la preparazione della striscia settimanale si fissa sul tamburo un pezzo di nastro di melinex, della lunghezza di 345 mm, partendo dalla zona delimitata dalle due tacche nere, mentre la tacca verde che rappresenta l'inizio del campionamento, coincide nell'apparecchio con la fenditura attraverso cui viene aspirata l'aria dall'esterno.



**Fig.13 – Colorazione del vetrino.**

Il nastro viene fissato al tamburo grazie ad una piccola striscia, adesiva su entrambi i lati, disposta trasversalmente alla direzione del nastro. Sul melinex così fissato si applica con un pennello morbido la soluzione di olio di silicone, il tamburo così preparato viene conservato al riparo dalla polvere. Al termine della settimana di campionamento il nastro viene tolto, usando una pinzetta, dal tamburo ed adagiato sul cutting block, prestando attenzione di sistemare all'estrema sinistra il punto di inizio del campionamento.

Con una lama si incide il nastro in corrispondenza delle sette divisioni, poi si completa il taglio utilizzando le forbici. L'operazione è delicata in quanto occorre far bene attenzione a non toccare il nastro nella zona campionata e a non invertire la sequenza dei pezzi di nastro che risultano lunghi 48 mm l'uno. Su normali vetrini da microscopio si stende un sottile strato di gelatina glicerinata (10 gr di gelatina + 60 ml di acqua + 55 ml di glicerina + 2 gr circa di fenolo + fucsina in gocce) a caldo, vi si adagia il nastro, quindi si prende un coprioggetto, si applica una etichetta di identificazione, infine si lascia asciugare per qualche ora prima di effettuare i conteggi al microscopio ottico.

### **LETTURA DEI CAMPIONI**

I caratteri diagnostici per l'identificazione delle diverse specie polliniche sono i seguenti.

- 1) Diametro dei granuli pollinici.
- 2) Struttura della parete: caratteristiche dell'intina e quelle dell'esina, con le sue sculture e le varie aperture.
- 3) Forma del granulo pollinico.
- 4) Disposizione delle aperture germinali semplici e composte, loro numero e loro disposizione, che in genere sono costanti per ogni specie.



Occorre tenere presente che granuli pollinici della stessa specie possono apparire diversi a seconda che si osservino in proiezione equatoriale o polare.

Per una corretta lettura ed identificazione delle particelle si possono utilizzare degli appositi atlanti dei pollini ritrovabili in libreria.

Il monitoraggio delle particelle aerodiffuse si deve basare su di un metodo standardizzato, in modo da consentire l'utilizzo dei dati confrontabili tra loro.

Il metodo corretto di lettura dei campioni, tale da garantire la validità del metodo statistico adottato, si basa sui seguenti criteri di base:

- a) le strisciate di lettura dei vetrini di campionamento devono essere distribuite tra la zona marginale, che va esclusa, e la zona mediana.
- b) Le strisciate devono essere contigue nel senso della lunghezza del nastro, che è di 48 mm, in maniera da comprendere l'intero arco della giornata.
- c) La superficie indagata deve essere sufficientemente rappresentativa dell'intera area di lettura. Si ritiene, a questo proposito, che gli ingrandimenti da usare ed il numero delle strisciate debbano essere scelti in maniera tale che la superficie di lettura rappresenti almeno 1/12 della superficie totale del nostro giornaliero.



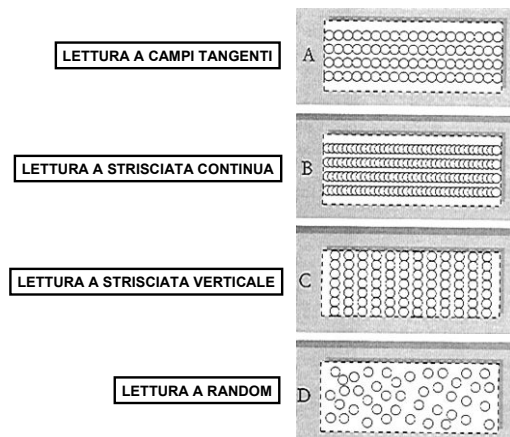
**Fig. 14 – Lettura al microscopio ottico.**

Qualora la zona esplorata risultasse insufficiente sarà necessario ridurre l'ingrandimento dell'obiettivo o aumentare il numero delle bande da leggere.

La lettura di ogni strisciata può essere eseguita utilizzando, in alternativa, le seguenti due metodiche:

- a) lettura per campi tangenti: in tal caso il calcolo della superficie di lettura si attuerà moltiplicando l'area di un singolo campo microscopico per il numero dei cerchi compresi in ogni strisciata. E' questo il metodo più utilizzato dalla maggior parte dei lettori.
- b) Lettura per campi longitudinali: perlustrando l'intera banda longitudinale, la quale consiste in un rettangolo di base uguale alla lunghezza della banda (48 mm) e di altezza pari al diametro di campo.

Entrambi questi metodi di lettura ci forniscono la concentrazione media giornaliera di particelle per metro cubo d'aria. Per effettuare letture orarie occorre compiere 24 scansioni verticali, cioè una ogni 2 mm esatti.



**Fig. 15 - Metodiche di lettura del vetrino microscopio ottico**

**FORMULE DI CALCOLO**

Una formula di calcolo, che tiene conto del campo microscopico, dell'ingrandimento usato e del numero di bande esaminate, consente di calcolare un "fattore di conversione". Questo valore moltiplicato per il numero di particelle conteggiate, ci fornisce la concentrazione media per metro cubo di aria esaminata.

Ecco un esempio di calcolo:

Se la lettura del vetrino è fatta per campi tangenti il calcolo verrà eseguito come segue:

**Sistema a)**

$$\text{Conc. media giorn./mc aria} = P \times \frac{672 \text{ mm}^2}{[(0,29 \times 0,29 \times 3,14) \times 4 \times 82,75]} \times \frac{1}{14,4} =$$

$$P \times \frac{672}{87,33} \times \frac{1}{14,4} = P \times 0,53 \text{ "fattore di conversione"}$$

dove 82,75 è il numero dei campi tangenti per strisciate che si ottiene dividendo 48 mm per 0,58 mm (campo microscopico usato dall'operatore).

**Sistema b)**

$$\text{conc. med. giorn./mc aria} = p \times \frac{\text{sup. tot. nastro (mm}^2\text{)}}{\text{sup. tot. esplorata}} \times \frac{1}{\text{mc aria esaminata/die}} =$$

$$= P \times \frac{14 \text{ mm} \times 48 \text{ mm}}{(0,58 \text{ mm} \times 48 \text{ mm}) \times 4} \times \frac{1}{0,6 \text{ mc} \times 24 \text{ h}} = P \times \frac{672 \text{ mm}^2}{111,36} \times \frac{1}{14,4} =$$

$$= P \times 6,03 \times \frac{1}{14,4} = P \times 0,418 \text{ fattore di conversione}$$

dove 0,58 è il diametro del campo microscopico impiegato dall'operatore. Quindi esaminando l'intera banda longitudinale ed eseguendo 4 strisciate con ingrandimento a 25X , il fattore di conversione è di 0,418 che equivale alla superficie esplorata di 111,36 mm<sup>2</sup> che è 1/6 della superficie totale campionata. Questo valore è ampiamente al disotto del valore minimo accettabile perchè il calcolo statistico di lettura sia valido, ci consentirebbe anche di portare a 3 il numero delle strisciate di lettura.

Al fine di calcolare la concentrazione pollinica oraria per mc d'atmosfera si procede come segue:

$$P \times \frac{\text{sup. camp. / ora}}{\text{sup. esplor. /ora}} \times \frac{1}{\text{mc aria /ora}} = P \times \frac{2 \times 14 \text{ mm}}{0,58 \times 14 \text{ mm}} \times \frac{1}{0,6} =$$

$$P \times \frac{28}{8,12} \times \frac{1}{0,6} = P \times 5,75$$

Non ha rilevanza scientifica lo stabilire l'ingrandimento dell'obiettivo o dell'oculare o il numero delle bande da esaminare purché sia salvaguardato il rapporti fra la superficie campionata e quella esaminata.

Considerando che l'efficienza del campionatore non raggiunge il 100%, ma che per particelle di 10 millimicron è mediamente intorno al 50% le concentrazioni rilevate saranno al di sotto dei valori reali.

### Campionatori portatili

Esistono in commercio anche campionatori portatili, di misura più ridotte e dal peso limitato. Questi sono stati progettati per attività di campionamento atmosferico di breve durata, sia indoor che outdoor. Possono essere alimentati da batterie ricaricabili con autonomia di 24 ore.



**Fig. 16 – Modello Campionatore Portatile Ditta Burkard**

## Campionatore portatile e personale

Esiste oggi anche la possibilità di effettuare dei campionamenti aerobiologici in diretta prossimità del soggetto allergico o nel suo ambiente di vita utilizzando un campionario volumetrico portatile (PARTRAP FA 52) ideato per una valutazione aerobiologica e microbiologica precisa microambientale

L'apparecchio silenzioso è di piccole dimensioni, di peso contenuto, è costituito da una turbina aspiratrice a flusso fisso, costante di 10 litri al minuto (simile all'Hirst), è corredato da differenti camere campionatrici per poter effettuare i diversi tipi di campionamento aerobiologico di tipo personale od ambientale che vanno scelti prima di effettuare il campionamento a seconda dello scopo del campionamento; può infatti campionare particelle aerodisperse organiche ed inorganiche con diametro variabile da 1 a 10 micron, è prevista anche una camera campionatrice per batteriologia e micologia che permette di campionare aria atmosferica direttamente su una capsula di Petri equipaggiata con terreno di coltura, una camera campionatrice a filtro per batteri e miceti che campiona direttamente su un filtro ad esempio tipo Sartorius, una camera a bolle che campiona in liquidi (metodo impinger) ad es. acqua distillata o mezzi di coltura liquidi sterili.

L'apparecchio volumetrico fornisce delle risposte di tipo qualitativo, quantitativo (numero di particelle o Unità Formanti Colonie UFC per metro cubo di aria aspirata).

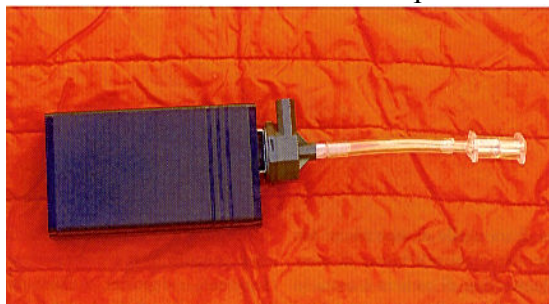


Fig. 17 – Campionatore Volumetrico Portatile FARTRAP FA 52

Tabella diversi apparecchi campionatori usati per scopi allergologici

Nome di apparecchio	Tipo di campionamento	Materiale utilizzato
Durham	Gravitazionale	Piastre glicerinate
Tauber	Gravitazionale	Tubo cilindrico
Cour trap	Impatto	Superfici glicerinate
Rotorod sampler	Impatto	Superfici glicerinate
Burkard	Volumetrico	Melinex siliconato
Lanzoni VPPS 2000	Volumetrico	Melinex siliconato
PARTRAP FA 52	Volumetrico	Melinex siliconato

## METODICHE DI CAMPIONAMENTO FUNGINO

Purtroppo non esistono ancora, a tutt'oggi, dei protocolli standardizzati per il campionamento di muffe e spore fungine. Questa carenza metodologica dovuta alle caratteristiche intrinseche di questi organismi, al loro ambiente e ai substrati su cui si sviluppano, contribuisce a rendere ancor di più complicato il compito di chi voglia affrontare il problema dell'impatto dei funghi sulla salute umana

(10). Una prima differenziazione dovremo farla tra campionamento outdoor ed indoor, considerato che, in generale, come abbiamo già detto prima, le presenze fungine indoor risentono direttamente delle presenze outdoor. Tuttavia il problema indoor diviene importante laddove si sospetti l'inquinamento di un locale o addirittura una "malattia dell'edificio malato". Trattandosi di patologie dai contorni spesso assai sfumati sarebbe ancor più importante, in questo caso, dotarsi di metodologie rigorose ed unanimemente condivise. Lo scopo del campionamento è quello di accertarsi della reale presenza fungina, identificarla e quantificarla. Nel caso delle spore fungine poi non è sufficiente solo un campionamento dell'aria ambiente ma anche quello delle superficie dove essi possono essere localizzati, in ambiente indoor (11).

Esistono diversi parametri significativi per definire che presenza fungina potenzialmente lesiva per la salute. Per prima cosa un'analisi morfologica e colturale per determinare, in maniera semiquantitativa, i generi delle spore presenti ed il numero delle stesse ( 12,13). In secondo luogo si potrà procedere alla determinazione di eventuali allergeni fungini e non, nella polvere presente nell'ambiente, utilizzando test radioimmunologici. (RAST, ELISA) (14). Due sostanze importanti da determinare sono l'Ergosterolo e i Glucani ( 15 ). L'ergosterolo si trova sulla membrana della maggioranza dei funghi , ma non in quella di altri microrganismi( 16) . Il Beta-1,3-D Glucano è un polimero con catene glucidiche presente sulle membrane di funghi e batteri. Svolge attività di attivatore cellulare di macrofagi e neutrofili( 17) Prodotti del metabolismo dei funghi, e pertanto utili da determinare sono le Micotossine. Queste hanno lo scopo di inibire la crescita di altri organismi competitivi (18). Possono essere dosate nell'ambiente con metodi cromatografici ed anche nelle urine dei soggetti esposti. Infine i funghi producono anche i VOC (composti organici volatili) che conferiscono il caratteristico odore alle muffe. Ne sono stati isolati, sino ad oggi, più di 500. Agiscono come sostanze irritanti e la loro determinazione può essere utile per identificare fonti nascoste di contaminazione.

La conta delle spore fungine indoor dovrà sempre essere affiancata dalla conte delle medesime spore in ambiente outdoor, per utile comparazione. Se le differenze qualitative tra outdoor ed indoor fossero marcate questo indicherebbe la possibilità di un inquinamento locale significativo.

Non è poi sufficiente, in genere, un semplice campionamento morfologico ma andrebbero determinati, dai campioni prelevati eventuali antigeni e/o tossine. I campionamenti andrebbero effettuati sia prima sia dopo aver rimosso le eventuali fonti d'inquinamento.

Quando si vuole campionare in ambiente indoor, allo scopo di individuare eventuali fonti di inquinamento fungino il primo passo ovviamente deve essere rappresentato dal sopralluogo sul sito. Questo sopralluogo dovrà essere orientato necessariamente all'individuazione di eventuali fonti di umidità. Queste possono dividersi in due tipi: o per condensazione o per infiltrazione. La condensazione avviene quando l'aria giunge a contatto con una superficie della temperatura più bassa del punto di rugiada dell'aria. Questo è definito come la temperatura in cui l'aria raggiunge il 100% di umidità.

Le infiltrazioni si verificano quando l'acqua entra nelle pareti degli edifici a seguito di alluvioni, di perdite dal soffitto o rotture di tubi dell'acqua. In alcuni casi la infiltrazione è molto evidente, con immagine di macchia nerastra con alone sul muro. Quando si svolge il primo sopralluogo sarebbe utile scattare qualche foto per documentare lo stato iniziale delle macchie (10).

### **Campionamento diretto con nastro**

In questi casi è opportuno il campionamento direttamente dalla superficie. Il sistema più semplice è quello che utilizza un nastro trasparente gommato. Questo pezzo di nastro viene posizionato accuratamente sulla superficie da campionare e poi trasferito su di un vetrino da microscopio ottico. Con la visione al microscopio si può confermare la presenza o meno di funghi, identificare il genere e valutare una stima semiquantitativa del numero dei singoli taxa (19). Il campionamento delle spore vitali dell'area incriminata richiede più tempo, in quanto dipende dal tempo di crescita del fungo. Questo metodo prevede il prelievo del materiale, tramite una spatola di plastica o con del cotone, e l'inseminazione su di un terreno di coltura. Il vantaggio di questo secondo metodo è

quello di poter identificare oltre che il genere anche la specie. Gli svantaggi sono nel fatto che richiede più tempo e che le specie che crescono più in fretta tendono a predominare sugli altri. Inoltre alcuni generi, come lo *Strachybotrys*, crescono poco nella maggior parte dei terreni di coltura. Nella prassi è giusto impiegare il campionamento con nastro trasparente solo per confermare l'esistenza di spore; in seguito si potranno identificare le specie con le colture. I dati saranno indicati come CFU (Colony-forming unit) per cm<sup>2</sup> o in maniera semiquantitativa, utilizzando una scala arbitraria.

### **Campionamento dell'aria indoor**

In ambiente indoor i bioaerosols si formano quando l'aria esterna penetra negli ambienti interni (20). Un insufficiente ricambio dell'aria può comportare disturbi respiratori nei soggetti presenti nell'ambiente. Un metodo indiretto per misurare l'adeguatezza della ventilazione dell'ambiente può essere fornito dalla misura della concentrazione di CO<sub>2</sub>.

### **Tecnica dell'esposizione delle capsule di Petri**

Secondo questa pratica si espongono nell'ambiente in esame le piastre contenenti il terreno colturale adatto: i miceti impattano per gravità e a causa di correnti aeree sulle capsule esposte, queste vengono successivamente incubate a temperature opportune, in seguito si sviluppano colonie che possono essere contate e analizzate.

### **Campionamento attivo**

Per mezzo dei metodi quantitativi (attivi) di campionamento dell'aria è possibile procedere alla aspirazione di quantità fisse e predeterminate di aria ed esprimere le concentrazioni di spore con un dato standardizzabile e riproducibile quale il numero per mm<sup>3</sup> di aria (21). Inoltre con questi metodi si aspirano grandi volumi di aria confinata minimizzando le differenze di distribuzione nell'aria dei batteri in funzione delle correnti, della temperatura, delle dimensioni degli aggregati, ecc. La caratteristica comune ai vari tipi di campionamento volumetrici di aria è quella di essere dotati di potenti sistemi di aspirazione dell'aria la quale viene convogliata su un terreno di coltura (liquido o agarizzato) con modalità tali da permettere l'intrappolamento delle particelle ivi sospese, le quali, al termine di una adatta incubazione, danno origine sul terreno di coltura a colonie isolate che si possono numerare e identificare.

### **Campionatori**

I sistemi di campionamento dell'aria per impatto su terreno solido sono raggruppabili in due fondamentali categorie:

1. campionatori multistadio;
2. campionatori monostadio.



**Fig. 18 - Campionatore Fungino Andersen**

Nel *campionatore multistadio di Andersen* l'aria aspirata viene fatta passare attraverso una serie di filtri con pori di diverse dimensioni in modo che le particelle sospese, compresi gli aggregati batterici aerei, vengono trattenute in funzione del loro diametro sulle superfici di una serie di piastre con terreno nutritivo. Alla fine del processo le piastre vengono incubate e si procede al conteggio delle colonie cresciute. Il campionatore di Andersen, munito di pompa aspirante, è decisamente ingombrante e utilizza per ogni campionamento un numero non indifferente di piastre di agar.

I *campionatori monostadio* sono apparecchi poco ingombranti e molto maneggevoli, nei quali l'aria aspirata viene convogliata sulla superficie del terreno nel quale i miceti rimangono intrappolati e danno origine, dopo adatta incubazione, a colonie ben visibili.

Il *campionatore monostadio SAS* aspira ogni minuto 180 litri di aria che viene inviata su una superficie di un terreno di coltura prescelto dall'operatore in relazione agli scopi della ricerca; inoltre l'apparecchio ha la possibilità di variare i volumi di aspirazione dell'aria in funzione della più o meno marcata presenza microbica presunta.

Elenco dei diversi campionatori fungini disponibili in commercio

NOME APPARECCHIO	TIPO DI APPARECCHIO	MATERIALE UTILIZZATO
Allergenco MK-3	A impatto su vetrino	Vetrino con gelatina
Anderson single stage	Campionatore multistadio	Capsula di Petri
Anderson 2 stage	Campionatore multistadio	Capsula di Petri
Anderson 6 stage	Campionatore multistadio	Capsula di Petri
All Glass Impinger	Campionatore multistadio	Liquido
Mattson-Garvin Air Sampler	A impatto su vetrino	Capsula di Petri
Burkard Viable Sampler	Campionatore multistadio	Capsula di Petri
Burkard 24 Hour Indoor Sampler	A impatto su vetrino	Vetrino con gelatina
Dry cyclone sampler	Cyclone collector	Pipette Eppendorf
Spin Con	Ad impatto tangenziale	Liquido
Wetted Cyclone Sampler	Ad impatto tangenziale	Liquido
PARTRAP FA 52	A impatto su vetrino A impatto su capsula di Petri Direttamente in terreno di cultura liquido o solido	Vetrino con gelatina Capsula di Petri Terreno di cultura liquido
Lanzoni Indoor Collector	A impatto su vetrino	Vetrino con gelatine o nastro adesivo
Rotorod	Impatto su asta movente	Asta con materiale adesivo
Air-O-Cel	Impatto su di una superficie rivestita	Acetato di cellulosa
SAS	Campionatore multistadio	Capsula di Petri

**Relazione finale del campionamento aerobiologico**

Al termine del campionamento sarebbe doveroso fornire una relazione dettagliata sui risultati ottenuti e sui rimedi che si potrebbero utilizzare per modificare l'ambiente a vantaggio dei nostri pazienti (10).

In primo luogo bisogna esporre l'obiettivo principale del campionamento, elencando tutte le ipotesi di partenza, con una descrizione del tipo di ricerche effettuate e delle metodiche utilizzate.

La relazione dovrebbe presentare anche alcune informazioni sull'edificio, come l'ubicazione, le dimensioni, la data di costruzione, il numero di occupanti, infine la data e le ore in cui si è effettuato il campionamento. Potrebbe anche essere utile allegare una pianta dell'edificio.

Descrizione delle eventuali anomalie già evidenti ad un primo esame (come macchie d'umidità, sistemi d'aerazione, tipo di copertura del tetto, ecc.)

Descrizione dei campionamenti effettuati : quali e quanti.

Risultati analitici . Questi devono essere presentati per tutti i singoli campioni (22); dovrebbero includere tutti risultati delle misurazioni effettuate; possibilmente tra queste andrebbero inserite: temperatura dell'aria, l'umidità relativa, CO<sub>2</sub>, CO, SO<sub>2</sub> NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> e VOC . Le conte delle spore dovrebbero segnalare l'ambiente specifico nel quale sono state effettuate, l'orario in cui è stato effettuato il campionamento ed un confronto con il contemporaneo campionamento outdoor.

I risultati delle colture su capsule di Petri dovrebbero essere in CFU.

Il rapporto dovrebbe specificare anche gli strumenti usati per il campionamento e che metodi o protocolli sono stati utilizzati.



## BIBLIOGRAFIA

- 1) Gregory P.H. The microbiology of the atmosphere. Leonard Hill, Bucks, England, 1972.
- 2) Chatigny M.A., Macher J.M., Burge A., Solomon W.R. Sampling airborne microorganisms and aeroallergens. In : Air sampling instruments. 7<sup>th</sup> ed. S.V. Hering Tehnical Editor, 1989.
- 3) Blackley CH. Experimental Researches on the Causes and Nature of Catarrhus Aestivus (Hay-Fever and Hay-Asthma). London, Ballière Tindall and Cox, 1873.
- 4) Durham O.C. The volumetric incidence of airborne allergens. IV. A proposed standard method of gravity sampling, counting and volumetric interpolation of results. J. Allergy 1946;17:79-86
- 5) Tauber H. A static non-pverload pollen collector. New Phytol. 1974; 73:359-369
- 6) Perkins W.A. The rotorod sampler. 2nd semiannual Report, C.M.L. 186, Aerosol Lab. Dept. Chemistry Chem. Engin., Stanford Un. 1957
- 7) Hirst JM An automatic volumetric spore trap. Annals of Applied Biology 1952 39, 257-265.
- 8) Andersen A.A. New sampler for the collection, sizing and enumeration of airborne particles. J.Bacteriol. 1958;76:471-484
- 9) Leuschner R.M., Boehm G. Investigations with the "individual pollen collector" and the "Burkard trap" with reference to hay fever patients. Clin. Allergy 1979;9:175
- 10) Portnoy J.M., Barnes C.S., Kennedy K., Sampling for indoor fungi JACI 2004,113, 189-198
- 11) Committee on the Health Effects of Indoor Allergens NRC. Assessing exposure and risk. In *Indoor allergens: assessing and controlling adverse health effects*, eds Andrew M, Pope RP and Harriet Burge. the National Academies Press, Washington, DC 1993, 185-205.
- 12) Benninghoff W.S., Edmonds R.L. Ecological Systems Approaches to Aerobiology. I. Identification of Component Elemnets and their Functional Relationships. International Biological Program. US/IBP Aerobiology program. 1972, Handbook N.2 , Univ. of Michigan, Ann Arbor
- 13) United States Institute of Medicine Committee on the Assessment of Asthma and Indoor Air. *Clearing the air: asthma and indoor air exposures*, National Academy Press, Washington DC 2000.
- 14) Rogers CA. Indoor fungal exposure. Immunol Allergy Clin North Am 2003;23:501-518.
- 15) Lopez-Diaz T, BF. Production of patulin and cytochalasin E by *Aspergillus clavatus* during malting of barley and wheat. Int J Food Microbiol 1997;35:129-136.
- 16) Ruiz-Herrera J. Biosynthesis of beta-glucans in fungi. Antonie Van Leeuwenhoek 1991;60:72-81.
- 17) Rylander R, Lin R. (1→3)-beta-D-glucan—relationship to indoor air-related symptoms, allergy and asthma. Toxicology 2000;152:47-52.
- 18) Jarvis BB, Salemme J, Morais A. *Stachybotrys* toxins. 1. Nat Toxins 1995;3:10-16.
- 19) Fisher F, Cook N. *Fundamentals of diagnostic mycology*, W.B. Saunders, Philadelphia 1998.
- 20) Burge H. *Bioaerosols*, CRC Press, Inc, Jacksonville, Fla 1995.
- 21) Ogden E.C., Raynor G.S., Hayes G.V., Lewis D.M., Haines J.H. Manual for sampling airborne pollen. Hafner Press, New York, 1974; 182 pp.
- 22) Arlian LG, Morgan MS, Goelz JF. Quantitation of dust mites and allergen in small dust samples. J Allergy Clin Immunol 1999;104:707-709.