

CAPITOLO 10

LE SPORE FUNGINE COME AGENTI PATOGENI

Renato Ariano

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

I Funghi sono organismi viventi unicellulari e pluricellulari, che si nutrono di materiale organico in decomposizione (*saprofiti*) o delle sostanze nutritive sottratte ad altri organismi (*parassiti*). Essi costituiscono un Regno a sé stante, non appartenendo al Regno Vegetale, e sono suddivisi in divisioni, classi, sottoclassi, ordini, famiglie, generi, specie. In effetti, sotto le loro caratteristiche nutrizionali, assomigliano più agli animali che ai vegetali. In effetti gli esseri viventi si suddividono tra i PROCARIOTI (unicellulari come virus, batteri, alghe azzurre) ed EUCARIOTI a loro volte suddivisi in ETEROMORFI (animali e funghi) ed AUTOTROFI (vegetali). Esistono anche funghi *simbionti* che realizzano uno scambio di elementi nutritivi con le piante. I funghi non hanno foglie, fusti, fiori, radici e si riproducono per mezzo delle spore, organi microscopici che corrispondono ai semi delle piante superiori. Dalla germinazione delle spore si forma il *micelio*, un intreccio di minutissimi filamenti, detti *ife*. Le ife sono cellule complete con nucleo. E' il micelio il vero fungo, mentre quello che comunemente viene indicato con questo nome altro non è che il *carpoforo*, o micelio secondario, ossia il frutto. Appartengono al Regno di Funghi lieviti, muffe e funghi propriamente detti, alcuni dei quali sono commestibili. I funghi, presenti ovunque esistano altre forme di vita, sono responsabili, insieme ai batteri, della decomposizione di tutta la materia organica. Possiamo suddividerli, dalla nostra prospettiva di umani, in FUNGHI UTILI e FUNGHI DANNOSI. Sono utili all'uomo per l'alimentazione (per quanto riguarda le specie edibili), per la produzione di determinati formaggi, per la fermentazione (come enzimi di pane, birra, vino), per opere di rimboschimento (micorrize), come indicatori dello stato di salute di un bosco. Sono dannosi per l'uomo in quanto possono essere parassiti di colture, essere dannosi per gli alimenti, agenti di malattie (per infezione, tossicità e allergia). L'attuale nomenclatura binomia latina (genere-specie) è stata introdotta dal naturalista svedese Linneo, che nel 18° secolo descriveva e classificava le piante nella sua opera "*Systema Naturae*". In seguito questo stesso metodo fu esteso anche al Regno dei funghi. La *Tassonomia* è la disciplina che ha lo scopo di identificare con un nome in modo inequivocabile qualsiasi organismo o gruppi di organismi viventi. Invece le relazioni gerarchiche filogenetiche che intercorrono tra i diversi gruppi tassonomici sono invece catalogate tramite la disciplina denominata *Sistematica*. La classificazione tassonomica **dei funghi** ha subito notevoli cambiamenti negli ultimi 10 anni ed è tuttora in fase di aggiornamento. I criteri morfologico, fisiologico ed immunologico utilizzati in passato per identificare e posizionare sistematicamente una specie fungina, sono stati affiancati e spesso sostituiti da quello dell'analisi molecolare (PCR, RFLP, sequenziamento delle basidel DNA) che permettono una più sicura determinazione dell'identità **dei** funghi (1)(Nilsson, 2005). Sono conosciute circa 100.000 specie di miceti e circa 4000 specie di macromiceti, ovvero funghi apprezzabili per dimensione, aspetto, commestibilità. Buona parte sono riconoscibili ad occhio nudo, la maggior parte con l'aiuto di indagini approfondite,utilizzando il microscopio ottico. Il grande numero di entità è suddiviso in numerosi raggruppamenti, sezioni e sottosezioni, che riflettono le caratteristiche peculiari e costanti di un determinato numero di funghi. Il gradino finale dei raggruppamenti è rappresentato da un'unica specie fungina, detta *typus* . Da due classi principali (ascomiceti e basidiomiceti) si diramano grandi gruppi di funghi a lamelle, agaricales, russulales, di funghi a tubuli e pori salvo alcune eccezioni, boletales, di funghi a pori o aculei, poriales, solo per citarne alcuni. Gli ascomiceti sono caratterizzati dal fatto che le spore (6 o 8) si formano all' interno di cellule fertili a forma di

sacco chiamate **aschi**. Nei basidiomiceti le spore (2 o 4) si formano all'esterno di cellule fertili di forma allungata chiamate **basidi**.



Spora di *Alternaria* teneramente avvinta ad un granulo pollinico di *Parietaria*.

LA RIPRODUZIONE NEI FUNGHI può avvenire per semplice divisione del micelio, o attraverso modalità complesse di tipo sessuato o asessuato. La maggior parte delle specie produce spore, minuscole particelle di protoplasma racchiuse da una parete protettiva, che si disperdono facilmente nell'ambiente. Le spore sono le cellule della riproduzione; le loro dimensioni sono comprese tra i 10 e i 50 micron, per cui sono aerotrasportabili.

I funghi sono diffusi in tutti i tipi di ambienti. Il suolo è l'habitat naturale dei funghi saprofiti, ma è anche un serbatoio di funghi parassiti, che possono infettare piante e animali. Molti di essi sono in grado di decomporre la cellulosa presente nei tessuti vegetali e, pertanto, hanno un ruolo attivo nella produzione dell'humus. La funzione dei funghi, in natura, è quella di degradare notevoli quantità di materiale organico vegetale o animale e di composti solubili presenti nel suolo. Negli ambienti outdoor sono particolarmente numerosi nelle zone ombreggiate e umide. Si disseminano a partire dal suolo o da supporti organici vari invadendo qualsiasi tipo di derrate deperibili.

MICETI OUTDOOR

Esiste un gran numero ed una enorme diversità di spore fungine diffuse in atmosfera. Si può arrivare a concentrazioni superiori a 200.000 sp/m³. Di giorno prevalgono le spore "secche" come *Cladosporium*, *Alternaria*, *Drechslera*, *Curvularia*, *Phytomyces*. Di notte le basidiospore e le ascospore. Quando piove prevalgono le ascospore.

Miller e coll. (2), catalogarono, nel 1988, un'ampia lista di spore fungine presenti nella polvere di casa e in atmosfera. Le più rappresentative di queste specie sono *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, and *Aspergillus*. Takahashi (2) svolse un'analogia indagine, nel 1997, in Giappone, a Yokohama documentando che le specie predominanti erano *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*.



Foto Cladosporium

Siccome la fonte primaria per i funghi aerotrasportati sono i vegetali, è evidente che ogni significativa variazione nell'ambiente vegetale può mutare conseguentemente anche le conte di spore fungine in atmosfera. Inoltre, come avviene anche per le per fonti polliniche, le variazioni dell'atmosfera della terra possono cambiare le presenze fungine sui substrati. Il riscaldamento globale e l'incremento dei livelli di CO₂ atmosferico sono esempi classici di tali variazioni. Uno di questi esempi è fornito dalla dimostrazione che, a seguito del fenomeno del Nino, si sono verificate, nelle zone interessate, significative variazioni delle concentrazioni di spore fungine, in atmosfera, correlate a esacerbazioni di patologia allergorespiratoria (4).

In uno studio sperimentale la concentrazione di funghi aerotrasportati, soprattutto le spore, risulta aumentata di 5 volte in depositi di fogliame sottoposti a concentrazioni di CO₂ due volte superiori a quelle originarie (5). Ancora l'impiego dei funghi come agenti di biocontrollo, ovvero per il controllo e la limitazione dei patogeni di alcune piante, può contribuire a mutare le loro concentrazioni atmosferiche; esempi a tal proposito sono forniti dall'*Epicoccum nigrum*, utilizzato per combattere i parassiti dei girasoli e dalla *Beauveria bassiana*, un fungo di entomofilo utilizzato per combattere la mosca della frutta, in Messico, e gli scarafaggi (6). Anche il *Metarrhizum anisopliae* è stato impiegato per la lotta contro gli scarafaggi. Recentemente alcune specie fungine sono utilizzate, in Africa, per la lotta alla malaria da Anofeli (7).



Torula

MICETI INDOOR

Le spore dei miceti presenti outdoor si possono disperdere in atmosfera e possono anche penetrare all'interno delle abitazioni. Alcuni di questi miceti si sviluppano soprattutto nelle zone più umide delle abitazioni, come le cucine, i bagni e le docce. I funghi sono trasportati nell'ambiente indoor tramite la circolazione di aria o sono trasportati da fuori da animali, da esseri umani o perché adesi alle superfici di mobili o vari oggetti. La maggior parte di studi mostrano una costante presenza di spore fungine negli ambienti indoor, ed è dimostrato che, nella maggior parte dei casi, le concentrazioni fungine indoor sono correlate alle concentrazioni all'aperto. Esistono circa 100.000 specie diverse di funghi (incluse le muffe e i lieviti). Generalmente provengono dall'esterno, per cui si nota una sostanziale dipendenza stagionale (maggiore presenza durante l'estate e l'autunno), tuttavia l'ambiente indoor, anche se scrupolosamente pulito, offre innumerevoli occasioni e substrati di crescita. La maggior parte si sviluppano in condizioni di temperature comprese tra 10 e 35 C°, ma il contenuto di acqua è il fattore critico per la crescita. La combinazione tra fenomeni di condensa (spesso in luoghi inaccessibili), la presenza di sostanze organiche morte (necessario nutrimento), e l'instaurarsi delle opportune condizioni microclimatiche, favorisce la crescita di colonie. Presenza di umidità o fenomeni di condensa possono verificarsi per cattive tecniche costruttive anche all'interno dei muri o su alcune superfici interne. Spesso gli impianti di filtrazione dell'aria, che trattengono i funghi, sono luoghi ideali per la loro proliferazione che avviene nei filtri stessi.

Nell'aria la concentrazione di funghi è espressa in CFU/m³ (Colony Forming Units). Negli ambienti indoor si sono registrate concentrazioni generalmente comprese tra 10 e 20.000 CFU/m³ con picchi fino a 400.000 CFU/m³. Il rapporto tra concentrazione indoor e outdoor è molto variabile e dipende dalla specie.



Alternaria

L'umidità è il fattore critico più importante nel determinare la crescita di funghi indoor. Fonti di umidità nelle abitazioni sono costituite dalle infiltrazioni d'acqua nelle pareti, soffitto, pavimenti. Sovente accade che i mobili della cucina nascondono macchie d'umidità per cui l'identificazione

della fonte allergenica è difficoltosa. Si considerano come livelli critici di umidità relativa il 30% ed il 70%. Sotto il 30% le muffe non crescono mentre sopra il 70% trovano un ritmo di crescita ottimale. Nelle abitazioni l'umidità si viene a determinare in particolari condizioni come: condense sopra superfici fredde, finestre e davanzali d'inverno. pavimenti freddi d'inverno, condizionatori d'aria d'estate, pareti in cartongesso, materiali in cellulosa, finestre anodizzate. Si considera inoltre tra le cause dell'incremento dell'umidità delle abitazioni, negli ultimi 30 anni, il cresciuto impiego di lava stoviglie e di lavatrici, così come quello di vaporizzatori ed umidificatori, infine i sempre più numerosi edifici "sigillati" per conservare il calore. Qualcuno ha voluto definire questi edifici vere e proprie "Trappole d'umidità". I funghi maggiormente isolati in ambiente indoor, secondo alcuni lavori di campionamento, sono abitualmente appartenenti alle seguenti specie: Penicillium (96%), Cladosporium (89%), Ulocladium (62%), il Geomyces (57%), ed Sistroneura (51%) (9).



Botrytis

DIMENSIONI DELLE SPORE

Le dimensioni delle spore vanno dai 2 μm a 10 μm di diametro e possono così penetrare nelle vie aeree più profonde. La concentrazione delle spore fungine nell'atmosfera decresce con l'altitudine; ad un'altitudine di 45 m dal suolo le aerospore fungine sono ancora presenti in maniera continua a concentrazioni variabili che possono andare da 10.000 a 20.000 spore per metro cubo.

EFFETTI NOCIVI SULLA SALUTE A CAUSA DI ESPOSIZIONE FUNGINA

Esistono tre meccanismi patogenetici alla base delle malattie indotte da funghi: le infezioni, l'allergia e la tossicità.

INFEZIONI: infezioni fungine della pelle sono comuni nella popolazione, a causa di alterazioni della barriera mucosale. Solo un numero limitato di funghi sono patogeni aggressivi per l'uomo, in situazioni di esposizione massiva (ad esempio: coccidiomicosi, histoplasmosi, blastomicosi). Un aumento del rischio di infezioni fungine si presenta soprattutto in individui con deficit immunologico primario o secondario. Esistono difatti micosi endogene dovute a funghi saprofiti, soprattutto dell'apparato gastrointestinale, che si sviluppano per un indebolimento delle difese immunologiche (micosi opportunistiche), a seguito di altre malattie (diabete, neoplasie, alcolismo. Dopo terapie prolungate con steroidi o antibiotici). Generi comuni in questo caso sono Candida, Criptococcus, Aspergillus, Mucor.



Penicillium

ALLERGIA: il primo ad identificare i funghi come causa di allergia fu Blackley nel 1873 (9). Da allora si sono aggiunte numerose evidenze che dimostrano casi di asma indotti dall'inalazione di spore fungine. Più difficile è la dimostrazione di una rinite allergica causata da funghi, in quanto non disponiamo ancora di evidenze che dimostrino il rapporto causale tra funghi e rinite, anche se il documento ARIA ha oramai chiarito gli stretti rapporti ed interdipendenza che esistono tra asma bronchiale e rinite allergica. Inoltre non vi sono evidenze neppure per un rapporto tra esposizione ad allergeni fungini ed insorgenza di dermatite atopica, orticaria, angioedema o anafilassi.

Tuttavia anche il ruolo delle muffe nella patologia respiratoria non è ancora del tutto definito a causa dei problemi diagnostici legati alla carenza degli estratti attualmente disponibili). E' probabile che vi sia una sottostima del problema. Sono state individuate circa 40 proteine fungine allergeniche diverse. Esiste peraltro un'ampia cross reattività tra le diverse specie (10, 11).

E' stato valutato che circa il 10% della popolazione presenta IgE specifiche nei confronti delle comuni muffe inalanti. Circa la metà di questi individui (ovvero il 5% della popolazione) presenterà, nel corso della propria vita, sintomatologia allergica, a seguito dell'esposizione a questi allergeni fungini. Parecchi pazienti allergici spesso mostrano reattività IgE a numerosi funghi, anche senza precedente esposizione a certe specie fungine. Questo avviene per l'ampia presenza di epitopi comuni. Sarebbe importante identificare questi epitopi comuni per ridurre il numero di estratti richiesti per la diagnosi e la terapia. La prevalenza dell'allergia ai funghi varia molto a seconda dei vari studi con variazioni dall'1 al 25% nella popolazione atopica (12, 13, 14, 15). In regioni dal clima umido è stata segnalata addirittura una prevalenza del 70% (16).

Il valore soglia per evocare una sintomatologia clinica e' stato calcolato in: 100 spore/m³ per *Alternaria*, 3000 spore/m³ per *Cladosporium*. La RAST-inibizione dimostra che micelio e spore condividono epitopi comuni. Tuttavia gli estratti allergenici presentano diversa potenza a seconda se sono preparati a partire dal micelio o dalle spore. Gli estratti prodotti dal micelio sono più potenti sia esaminati con il prick che con il RAST e con i tests di provocazione nasale. In genere si incontrano grandi difficoltà a standardizzare un allergene fungino. Non solo perché esistono grandi variazioni tra gli estratti di diverse specie ma anche perché lo stesso estratto può presentare supernatanti con composizioni molto diverse, a seconda delle condizioni della cultura. Inoltre, di solito, è difficile reperire un numero sufficiente di pazienti sensibili per effettuare la standardizzazione biologica. Purtroppo nella diagnostica per i miceti esiste una non omogeneità degli estratti per cui l'attuale diagnostica e immunoterapia sono effettuate con estratti che contengono miscelati tra loro componenti allergenici e non allergenici. Solo l'utilizzo di allergeni purificati (o ricombinanti) potrà ridurre le variazioni da lotto a lotto.

Un'altra patologia allergologica è la Polmonite da ipersensibilità (nota anche come alveolite allergica estrinseca) malattia allergica delle vie aeree e dell'interstizio causate dall'inalazione di allergeni veicolati da particelle organiche aerotrasportate. Questa malattia può progredire sino a produrre una fibrosi polmonare. L'inalazione di spore fungine può essere in causa solo in una minoranza di casi, normalmente come parte di una flora mista con altri microrganismi. La fase acuta della malattia è caratterizzata da una polmonite a cellule mononucleate, la fase subacuta dalla formazione di un granuloma interstiziale e la fase cronica da una infiammazione granulomatosa che sbocca poi in una fibrosi interstiziale. Si verifica una produzione particolarmente intensa di immunoglobuline IgG con precipitine specifiche, che sono utili per la diagnosi.

Un'altra patologia fungina allergologica è l'Aspergillosi broncopolmonare allergica che si verifica come complicazione in pazienti con asma allergica o fibrosi cistica. Questa malattia dipende dall'*Aspergillus fumigatus* che intrappolato nel muco bronchiale determina una sensibilizzazione con produzione di anticorpi IgE ed IgG. L'allergene più comune in questo caso è Asp f 1. La malattia è caratterizzata da tosse, dispnea, espettorato, febbre, perdita di peso, progressivo deterioramento della funzionalità respiratoria. Infine esiste la Rinosinusite Fungina Allergica, descritta per la prima volta nel 1976 da Safirstein (17), ma i criteri diagnostici e la definizione di questa malattia rimangono controversi. Agenti causali sono *Aspergillus fumigatus* e *Bipolaris spicifera*. I sintomi consistono in sinusite ipertrofica ricorrente in pazienti atopici. Normalmente si riesce a selezionare la specie fungina grazie alle culture su capsule di Petri. La malattia recidiva facilmente anche dopo interventi chirurgici o prolungata terapia steroidea per via sistemica.

EFFETTI TOSSICI : Come tutti gli altri microrganismi anche i funghi generano prodotti chimici necessari alla loro nutrizione e sopravvivenza. Questi prodotti possono risultare tossici per gli esseri umani a seconda della loro dose e della via di esposizione. Queste sostanze sono rappresentate da l'Ergosterolo, dai Glucani, dalle Micotossine e dai VOC (prodotti organici volatili). L'Ergosterolo si trova sulla membrana della maggioranza dei funghi, ma non in quella di altri microrganismi. E' un metabolita fungino sulla cui tossicità non vi sono prove sicure. 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.

TABELLA n. 1

LIVELLI INDOOR DI GLUCANI IN RELAZIONE ALL'ESTENSIONE DEI SINTOMI (tratto da *Environ Health Perspect* 1999; 107 -Suppl 3- :501-3)

	Controlli	Lavoro	Scuola
N° soggetti	405	19	20
Glucani ng/m ³	< 0,1	1,3	5,2
PERCENTUALE DI SOGGETTI CON SINTOMI			
Nasali	16	37	50
Mal di gola	11	37	45
Tosse secca	6	5	35
Cefalea	2	5	30
Astenia	21	56	75

Altri prodotti del metabolismo dei funghi, sospettati di tossicità per la razza umana, sono le Micotossine. Queste hanno lo scopo di inibire la crescita di altri organismi competitivi. La lista delle micotossine è molto lunga e può comprendere da molecole relativamente semplici come la limonina (un sesquiterpene) a strutture eterocicliche complesse (come la ciclosporina). Numerose specie fungine producono le medesime micotossine, o comunque con strutture molto simili tra loro, tali da essere difficile la differenziazione.

TABELLA n. 2

Micotossine prodotte da alcune specie fungine
(Modificato da Nielsen e coll.) (18)

Specie fungina	Tossine
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Meleagrina (antibiotico)
<i>Penicillium polonicum</i>	3-Metossi-viridicatina, verrucosidina, e verrucofortina
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Acido micofenolico
<i>Chaetomium</i> specie	Chetoglobosine A and C
<i>Aspergillus ustus</i>	Nessuna tossina
<i>Aspergillus niger</i>	Composti nafto-γ-pironi and tetraciclici
<i>Ulocladium</i> specie	Nessuna tossina
<i>Alternaria</i> specie	Etere alternariolo ed etere monometil alternariolo
<i>Paecilomyces</i> specie	Nessuna tossina
<i>Aspergillus versicolor</i>	Sterigmatocistin, 5-metossisterigmatocistina

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. Sono miscele di alcoli, aldeidi, amine, idrocarburi aromatici, chetoni, composti solforati, terpeni. Agiscono come sostanze irritanti e la loro determinazione può essere utile per identificare fonti nascoste di contaminazione. Recenti studi epidemiologici hanno associato sintomi respiratori in bambini e adulti alla presenza di umidità e muffe negli ambienti domestici. Funghi e muffe producono anche alcune tossine che si trovano nelle spore e nei filamenti. Nonostante i dati siano ancora incompleti queste tossine rappresentano un potenziale fattore di pericolo. Effetti certi di queste tossine sono di tipo respiratorio ed oculari, con congiuntiviti. Effetti incerti descritti sono invece costituiti da cefalea, astenia, perdita di memoria, nausea, rash cutanei e crampi muscolari. In numerosi studi è stata dimostrata l'esistenza di una relazione fra sintomi respiratori e presenza di muffe negli ambienti. I sintomi alle vie respiratorie specialmente gli attacchi asmatici e la tosse nei bambini vengono utilizzati quali indici per gli effetti sulla salute umana indotti dalle muffe negli edifici con problemi di umidità (19). Se da un lato gli studi scientifici hanno dimostrato l'esistenza di una relazione fra esposizione alle muffe ed effetti sulla salute umana dall'altro lato non è stato ancora stabilito il livello al quale la contaminazione diventa un rischio per la salute umana (20). Alcuni studi suggerirono che le case che presentano infiltrazioni d'acqua, con macchie di umidità, siano un elemento predittivo importante di varie disturbi, incluso

quelli respiratori. I bambini che vivono in case con infiltrazioni di umidità si lagnarono di mal di testa, congiuntiviti, epistassi, sinusiti, tosse, rinite ed anche sintomi gastrointestinali (21). Maggiore incidenza di asma fu riscontrata nelle scuole con problemi di infiltrazioni di umidità (22).



Fusarium

Inoltre, le spore dei generi *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Diplodia*, *Rhizopus* e *Mucor*, che sono spesso associati a colture di cereali, sono ritenute i probabili responsabili della Sindrome da poveri organiche tossiche (ODTS) molto comune in agricoltori e in individui esposti all'inalazione di polveri di cereali, fieno, funghi, batteri.

La sindrome è molto affine all'alveolite allergica estrinseca ed è caratterizzata da febbre, malessere, mialgie e infiammazione bronchiale. È stato utilizzato il termine "micotossicosi polmonare" per sottolineare, dal punto di vista eziologico, non tanto la componente micotossinica, quanto gli altri componenti aerotrasportati, come i componenti della parete fungina e d'altri microorganismi, le esotossine. In effetti le spore fungine e molti altri loro componenti, come β 1,3-glucani e mannoproteine, hanno dimostrato di avere elevata attività infiammatoria.

Nell'OTDS sembrano giocare un ruolo importante generi come *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Tuttavia sul ruolo tossico dei funghi sulla patologia umana esistono ancora molte controversie. Una ampia rassegna sull'argomento è stata svolta da Fung e coll. nel 2003 (23). Questo articolo analizzava tutti i lavori scientifici sull'argomento pubblicati dal 1966 al 2002. Sono stati selezionati 29 articoli. L'analisi delle evidenze raggiunte confermava che l'aumento della prevalenza delle patologie indoor da funghi è direttamente correlata all'incremento dell'umidità relativa. Tuttavia la tossicità specifica da micotossine fungine non sembra ancora stabilita in maniera inoppugnabile. Inoltre i metodi di campionamento non sono standardizzati e non si possono spesso confrontare studi diversi. A causa della mancata standardizzazione non è ancora stata definita una dose risposta. Analoghe considerazioni ha espresso Terr, in un più recente lavoro del 2004 (24). Il Position Paper dell'AAAI (25) conclude che la micotossicità da esposizione a micotossine inalate non è supportata da evidenze scientifiche e che è da considerare un evento improbabile. Si tiene invece possibile l'evenienza di reazioni irritative transitorie a carico degli occhi e delle vie aeree, ma non in altri organi o in maniera sistemica.

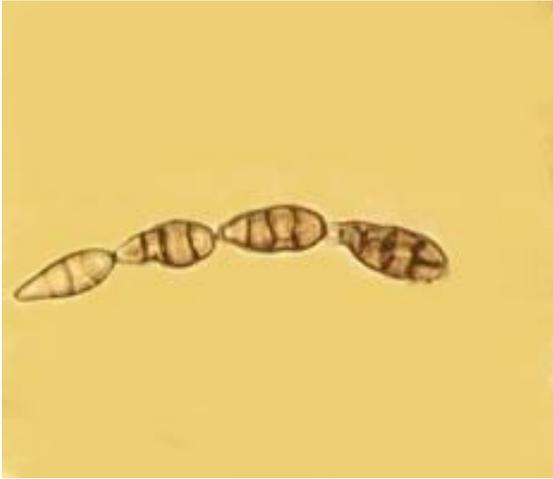


Foto di Epicoccum

FUNGHI PIU' IMPORTANTI DAL PUNTO DI VISTA ALLERGOLOGICO

I generi più spesso individuati come agenti causali di diverse forme di allergia sono i seguenti: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Penicillium*, *Botrytis*, *Mucor*, sono specie maggiormente presenti in atmosfera, a carattere ubiquitario. Esse costituiscono da sole circa il 50% di tutte le spore fungine identificabili dal campionamento dell'aria ambiente. Gli ambienti indoor, come quelli delle abitazioni, sono meno ricchi di spore rispetto all'atmosfera esterna. In quest'ultima la concentrazione di spore è assai correlata alla vegetazione in quanto la maggior parte delle spore aerodisperse ha un'origine fitoparassitaria, con un apporto non trascurabile anche di basidiospore di macromiceti. Le concentrazioni aree delle spore presentano fluttuazioni periodiche, con predominanza dei ritmi circadiani e stagionali, inoltre presentano variazioni legate alle condizioni meteorologiche.

L'Alternaria alternata è una specie comune e cosmopolita che si sviluppa su molte piante e su altri substrati come il suolo e alimenti, come i pomodori. Sembra essere uno dei generi più allergizzanti, in tutte le parti del mondo (26). In Italia rappresenta circa il 15% del totale delle spore presenti in atmosfera. Numerosi studi ne documentano il ruolo etiologico in vari casi di asma bronchiale (27). È considerato un micete dell'ambiente esterno e le sue presenze di incrementano quando il clima è caldo e umido. La dispersione delle spore di *Alternaria* si verifica durante i periodi di tempo asciutto ed i picchi più elevati si riscontrano a fine estate ed in autunno. Questi sono accompagnati dal più elevata velocità del vento e più bassa umidità relativa con picchi di presenza durante il pomeriggio, nei giorni di sole. I livelli più alti di *Alternaria* si riscontrano in aree coltivate a grano e cereali. In uno studio, negli U.S.A., che coinvolse più di 17.000 persone gli skin prick tests positivi ad *Alternaria* raggiunsero la percentuale del 3.6% della popolazione (28). Più del 70% dei pazienti con allergia ai miceti presenta sensibilità alla *Alternaria*. In un studio su larga scala su soggetti in età pediatrica, abitanti nelle periferie delle grandi città U.S.A., il 38.3% su 12,086 bambini asmatici presentavano positività nei confronti dell' *Alternaria* (29). In Europa 3% di pazienti in Portogallo e 20% di pazienti in Spagna , con allergopatie respiratoria presentavano positività per *Alternaria* o *Cladosporium* (30). Esistono numerose evidenze che dimostrano come la sensibilizzazione al *Alternaria* sia sovente associata a crisi d'asma (27). Questa relazione fu scoperta addirittura nel 1745 in soggetti che erano stati esposti al fungo in una cantina (31) a cui seguirono, nel corso degli anni numerose altre segnalazione, anche ben documentate. Purtroppo i diversi studi non sono perfettamente confrontabili tra loro in quanto la non standardizzazione degli estratti determina una scarsa omogeneità di risultati. Bruce e coll. (32) dimostrarono, nel 1977, che 50% di soggetti con sensibilità cutanea ad *Alternaria* avevano sintomi di asmatici correlati con livello delle spore di *Alternaria* nell'aria. Henderson e coll. (33) ha dimostrato, nel 1995, che la sensibilizzazione ad *Alternaria* in bambini in età scolastica nel Nord Carolina è associata con asma ricorrente.



Alternaria spp.

Un studio a San Diego, California, dimostrò nei bambini allergici che l'aumento delle concentrazioni di spora in atmosfera erano associati con uso aumentato consumo di broncodilatatori (34). Paradossalmente esisteva una migliore correlazione con l'incremento di spore di quelle spore fungine di cui non si disponeva di un estratto da testare. Questo studio dimostra, se ce ne fosse ancora bisogno, degli attuali grandi limiti della diagnostica fungina. indica la nostra impossibilità a valutare con accuratezza lo stato dell'esposizione allergenica fungina e dei nostri limiti nella possibilità di effettuare tests per sforzi attinenti. Dales e coll. (35) hanno poi dimostrato anche l'influenza di spore di Alternaria sulle esacerbazioni asmatiche in bambini ricoverati in reparti d'emergenza. Lo stesso autore, in un altro studio, svoltosi nell'arco di 6 anni, ha documentato che, durante i giorni di temporale le visite per asma aumentano di 10 volte, correlandosi con il raddoppio delle concentrazioni delle spore fungine, mentre si verificano scarse variazioni nelle conte polliniche, e senza variazioni nelle concentrazioni di fattori inquinanti atmosferici (36). Diversi studi hanno riscontrato un'associazione tra la sensibilizzazione nei confronti dell'allergene i Alternaria e la gravità di asma. Inoltre soggetti sensibilizzati ad allergeni fungini in generale, e ad Alternaria in particolare, sembrerebbero essere più a rischio per sviluppare asma severo rispetto a quelli con altre sensibilizzazioni allergeniche (37-40). Addirittura il rischio di asma mortale è stato direttamente correlato anche con la presenza di spore fungine nell'atmosfera (41). Un ulteriore fattore di rischio per le gravi crisi d'asma da Alternaria è stato individuato nei temporali. Nell'imminenza degli stessi si verificherebbero un maggior numero di crisi d'asma nei soggetti allergici all'Alternaria (42,43). Infine, non solo l'Alternaria, ma anche altre specie (come *Penicillium*, *Aspergillus*, *Candida* e *Cladosporium*) sarebbero incriminati come agenti etiologici di asma grave con ricovero ospedaliero (44).

La caratterizzazione degli allergeni dell'Alternaria

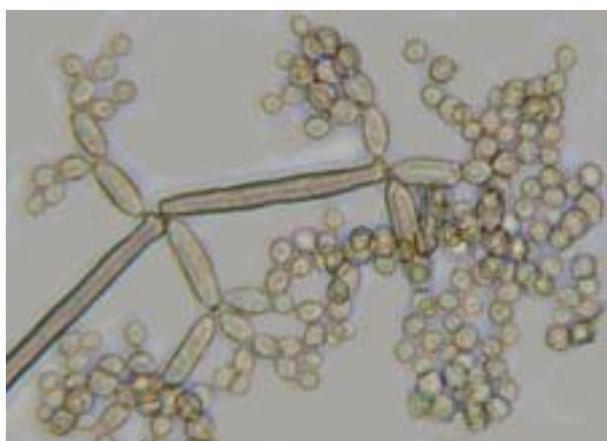
Gli studi sull'asma da Alternaria sono stati limitati a causa del fatto che non abbiamo a disposizione, nella pratica corrente, estratti allergenici standardizzati. Molti allergeni dell'Alternaria sono stati identificati e caratterizzati (45, 46). Alt a 1 è l'allergene maggiore, con un peso molecolare da 29 a 30 kd. Il 90% dei soggetti allergici all'Alternaria presentano anticorpi di IgE verso questa proteina. Alt a 2 è un altro allergene maggiore di Alternaria la cui molecola è stata clonata. Ha un peso molecolare di 25 kd. Circa il 60% dei soggetti allergici all'Alternaria presentano IgE specifiche verso questa proteina.

TABELLA N. 3

ALLERGENI DELL' ALTERNARIA IDENTIFICATI

Nome dell'allergene	Peso Molec. (kd)	Caratteristiche
Alt a 1	29–31	Allergene maggiore
Alt a 2	25	2 α -chinasi. Allergene maggiore
Alt a 3	20	Proteina dello shock
Alt a 4	>57	Isomerasi
Alt a 6	11	Proteina P ₂ ribosomale
Alt a 7	22	1,4-benzochinina reductasi
Alt a 10	53	Alcol deidrogenasi
Alt a 11	46–48	Enolasi presente anche in diverse altre specie fungine
Alt a 12	12	Proteina P ₁ ribosomale
GP70	70	Allergene maggiore

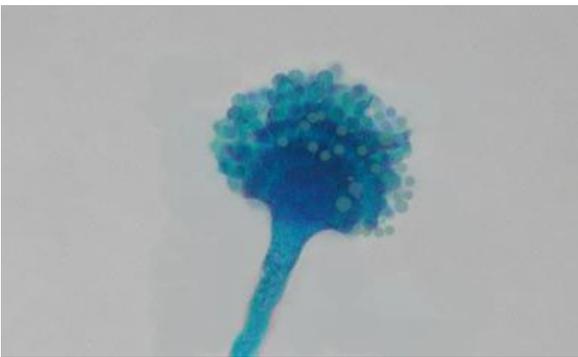
Il *Cladosporium herbarum* è il più frequente micete che si riscontra nei campionamenti aerobiologico, sia indoor che outdoor. Le spore di questo micete sono ben trasportate in atmosfera e possono affrontare lunghi percorsi. E' più abbondante outdoor con diffusione in tutto il mondo. In Italia le sue spore raggiungono spesso il 50% del numero totale delle spore in atmosfera. Normalmente è saprofita o patogeno delle piante. Le spore sono ben note come allergeniche. A seconda delle condizioni climatiche queste spore possono iniziare ad apparire nell'atmosfera nella primavera e presentare a un picco di presenza in tarda estate. Il *Cladosporium* è uno dei colonizzatori più comuni di piante malate o in degradazione e si presenta anche su diversi tipi di suolo e su diversi alimenti. Questo micete si trova frequentemente nei frigoriferi sporchi, cibi, in case con scarsa ventilazione, in aree umide. È stato isolato da serbatoi di carburante, prodotti estetici e tessuti. Il *Cladosporium* è uno dei miceti più ampiamente studiati, che produce molto spesso prick tests positivi in individui allergici. In uno studio di 1300 bambini asmatici dalla Finlandia, il 7.1% ha avuto reazioni positive SPT a *Cladosporium*, che risulta, in questo studio, il micete più comune.



Spore di *Cladosporium*

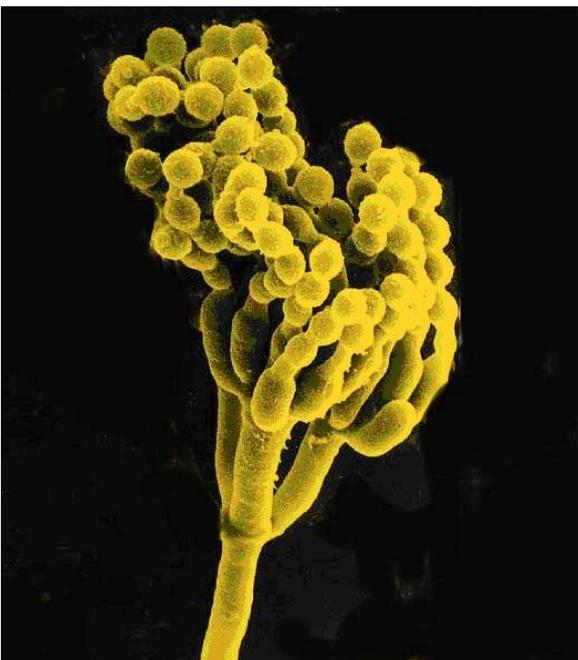
I pazienti che sono sottoposti ad una raddoppiata esposizione alle spore di *Cladosporium* raddoppiata presentano un rischio di asma aumentato del 52% (47).

L'Aspergillosi è una malattia causata da una specie di miceti (*Aspergillus fumigatus*) presenti dovunque in tutto il mondo, specialmente nell'autunno e nell'inverno, nell'emisfero settentrionale. Questi miceti crescono sul grano cereale, si trovano nei granai e anche all'interno in case umide, specialmente nel bagno. Solo alcuni di questi miceti possono causare malattia in esseri umani e in animali. La maggior parte della popolazione è naturalmente immune e non sviluppa malattia causata da *Aspergillus*. Tuttavia quando si verifica la malattia può assumere diverse forme. La gravità dell'aspergillosi è determinata da diversi fattori ma uno dei più importanti è rappresentato dalle resistenze immunologiche individuali. L'Aspergillosi broncopolmonare allergica è una patologia causata da allergia nei confronti delle spore dell'*Aspergillus*. È abbastanza comune in asmatici, fino al 2% . E' pure nei pazienti affetti da fibrosi cistica. I sintomi sono simili a quelli d'asma: episodi intermittenti di sentirsi malessere, con tosse e broncospasmo. Nell'aspergillosi protratta si può produrre fibrosi polmonare. Il trattamento è con steroidi per aerosol o per via orale. L' Itraconazolo è utile nel ridurre la quantità dello steroide.



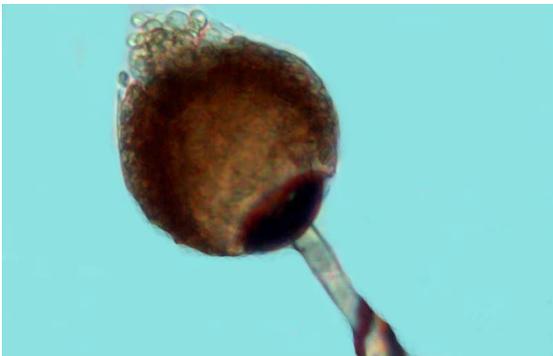
Aspergillus spp.

Il Penicillium è un micete assai comune su alimenti deteriorati e nelle cantine. Produce meno allergia degli altri miceti. È la "muffa" verde che si nota di solito negli ambienti umidi e poco luminosi. I miceti dei magazzini, come *Aspergillus* e *Penicillium* possono crescere in aree con umidità inferiore di 15% o più. I vaporizzatori e gli umidificatori possono contaminarsi con questi funghi e diventare una sorgente di spore di micete aerosolizzate. Il *Penicillium crisogeum* ha dimostrato di possedere proprietà asmogene dose dipendente negli animali da laboratorio (48).



Penicillium

La diagnosi specifica d'allergia ai miceti può essere stabilita solo da un insieme d'elementi quali l'anamnesi, prick tests, RAST. Sebbene sovente i prick tests risultino positivi la correlazione con la clinica di queste positività è spesso incerta, a causa della disponibilità di estratti non del tutto attendibili. Per la maggior parte dei funghi l'elemento inalato è la spora. Nonostante questo, la maggior parte delle preparazioni allergeniche commerciali utilizzano il micelio, prodotti metabolici ed un imprecisato e disomogeneo numero di spore. Numerosi ricercatori hanno dimostrato differenze nel contenuto proteico ed allergenico fra spore, micelio e prodotti metabolici. Le preparazioni allergeniche fornite dall'industria farmaceutica variano ampiamente per i seguenti motivi: diversità tra spore e micelio con riferimento al contenuto dell'antigene; mutazioni somatiche che causano variazioni del contenuto allergenico all'interno delle singole culture; variabilità interspecifica. La conseguenza di questi limiti intrinseci che determinano una povera qualità degli estratti diagnostici commerciali è che la prevalenza dell'allergia ai miceti risulta assai variabile da paese a paese. È per questa ragione sono necessari ulteriori studi sull'argomento. Fino a nuove conoscenze, quindi, è probabile che finora la diagnosi d'allergia ai miceti sia assai sottostimata.



Mucor

Prevenzione:

Gli individui sensibili alle muffe dovrebbero evitare l'esposizione alle zone "a rischio" per la crescita di muffe. In ambiente outdoor gli impianti di riciclaggio, le pile di concime, l'accumulo di foglie cadute, l'erba tagliata, i granai, i recipienti d'acqua. In ambiente indoor è importante evitare alti livelli d'umidità. Gli indumenti umidi, come le scarpe, dovrebbero essere collocati all'aperto. Evitare di conservare la frutta a temperatura ambiente per più di 72 ore, specialmente se conservata in contenitori di plastica. Il livello d'umidità relativa in casa dovrebbe essere mantenuto sotto il 50%. A tale scopo possono essere molto utili degli apparecchi deumidificatori. È importante mantenere una buona ventilazione della casa, aprendo periodicamente le finestre, soprattutto in quelle abitazioni dove esistono infissi anodizzati. Inoltre i miceti che crescono in alcuni ambienti della casa (bagno, doccia, cucina) possono essere eliminati con diversi prodotti fungicidi. Nella camera da bagno bisogna rimuovere tempestivamente eventuali tappetini bagnati e sostituirli con altri bene asciutti. Infine bisognerebbe evitare di impiegare tappezzeria sulle pareti, in quanto può essere ricettacolo di umidità e di muffe.

TABELLA N. 4

MEZZI DI PREVENZIONE PER LE ALLERGIE FUNGINE

Indoors

Tenere le finestre chiuse nei mesi caldi; usare condizionatori d'aria

Mantenere l'umidità relativa a <50%

Pulire le superfici lavabili con varicchina al 5% e soluzioni detergenti

Outdoors

Evitare di avvicinarsi a piante con presenza di muffa

Usare maschere apposite quando si lavora con materiale fungino

Usare auto con filtri d'aria anti spore ed antipolline

La bonifica degli ambienti invasi dalle muffe è un argomento complesso che esula dalla nostra trattazione. Si rimanda ad un approfondito documento dell'Occupational Health and Safety Administration (49). Purtroppo i recenti eventi legati all'evento dell'uragano Katrina, nel Nord America, hanno contribuito tristemente a fornire numerosi studi riguardanti le misure di ripristino e di bonifica (50, 51).

Terapia:

La terapia delle manifestazioni allergiche da spore fungine non differisce da quella delle altre forme di allergopatie, causate da altri allergeni. Occorre tuttavia sottolineare come la immunoterapia specifica, malgrado la mancata standardizzazione degli estratti, trovi una sua precisa collocazione. Viene infatti espressamente citata nel Posizion Paper del WHO del 1998 (52), che recita esattamente:

“ Per l'allergia alle muffe il trattamento di prima scelta è la bonifica ambientale. Gli studi disponibili hanno dimostrato l'efficacia clinica di vaccini standardizzati per *Cladosporium* o *Alternaria*. I pazienti con sintomi e positività ai tests diagnostici per queste muffe possono essere trattati con immunoterapia specifica.”

Numerosi studi hanno confermato, anche recentemente, l'efficacia e la sicurezza di questa forma di immunoterapia (53- 58).

BIBLIOGRAFIA

1. Nilsson HR, Kristiansson E, Ryberg M, Larsson KH. Approaching the taxonomic affiliation of unidentified sequences in public databases - an example from the mycorrhizal fungi. *BMC Bioinformatics*. 2005 Jul 18;6(1):178
2. Miller JD, Laflamme AM, Sobol Y, Lafontaine P, Greenalgh R. Fungi and fungal products in some Canadian houses. *International Biodeterioration and Biodegradation* 1988;24:103-120.
3. Takahashi T. Airborne fungal colony-forming units in outdoor and indoor environments in Yokohama, Japan. *Mycopathologia* 1997;139:23-33.
4. Freye HB, King J., Litwin CM. 47Variation of pollen and mold concentrations in 1998 during the strong El Nino event of 1997-1998 and their impact on clinical exacerbations of allergic rhinitis, asthma and sinusitis. *Allergy Asthma Proc*. 2001 , 22: 239-
5. Hameed AA, Khodr MI. Suspended particulates and bioaerosols emitted from an agricultural non-point source. *J Environ Monit* 2001;3:206-9.
6. De RW, Lopez FL, Liedo P. *Beauveria bassiana* as a pathogen of the Mexican fruit fly (*Diptera: Tephritidae*) under laboratory conditions. *J Econ Entomol* 2002;95:36-43.
7. Scholte EJ, Ng'habi K, Kihonda J, Takken W, Paaajmans K, Abdulla S, Killeen GF, Knols BG. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science*. 2005 Jun 10;308(5728):1641-2.
8. Grant C, Hunter CA, Flannigan B, Bravery AF. The moisture requirements of molds isolated from domestic buildings. *International Biodeterioration and Biodegradation* 1989;25:259-284.
9. Blackley C. *Experimental researches on the causes of catarrhus aestivus (hay fever or hay asthma)*, Bailliere Tindal & Cox, London 1873.
10. Birgit Simon-Nobbe, JACI 2000 Cross-reactivity between peptide 9 and full-length enolases of *C herbarum* and *A alternate*
11. Gupta R, Singh BP, Sridhara S, Gaur SN, Kumar R, Chaudhary VK, Arora N. Identification of cross-reactive proteins amongst different *Curvularia* species. *Int Arch Allergy Immunol*. 2002 Jan 127(1):38-46.
12. Linna O. Environmental and social influences on skin test results in children. *Allergy*. 1983 Oct;38(7):513-6.
13. Sastre J, Ibanez MD, Lombardero M, Laso MT, Lehrer S. Allergy to cockroaches in patients with asthma and rhinitis in an urban area (Madrid). *Allergy*. 1996 Aug;51(8):582-6.
14. Boulet LP, Turcotte H, Laprise C, Lavertu C, Bedard PM, Lavoie A, Hebert J Comparative degree and type of sensitization to common indoor and outdoor allergens in subjects with allergic rhinitis and/or asthma. *Clin Exp Allergy*. 1997 Jan;27(1):52-9.
15. Akcakaya N, Cokugras H, Camcioglu Y, Ozdemir M. Skin test hypersensitivity for childhood asthma in Istanbul during a period of 16 years. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2005 Jan-Feb;33(1):15-9.
16. Aukrust L. Mold allergy. *Introduction Clin Rev Allergy*. 1992 Fall;10(3):147-51.
17. Safirstein BH. Allergic bronchopulmonary aspergillosis with obstruction of the upperrespiratory tract. *Chest*. 1976 Dec;70(6):788-90.
18. Nielsen KF, Gravesen S, Nielsen PA, Andersen B, Thrane U, Frisvad JC. Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials. *Mycopathologia* 1999;145:43-56.
19. Nakai S. A review of epidemiologic studies on the health effects of indoor environments. *Nippon Kosshu Eisei Zasshi*. 1996 Mar 43(3):183-95.
20. Robbins CA, Swenson LJ, Nealley ML, Gots RE, Kelman BJ. Health effects of mycotoxins in indoor air: a critical review. *Appl Occup Environ Hyg*. 2000 Oct 15(10):773-84.

21. Mahmoudi M, Gershwin ME. Sick building syndrome. III. *Stachybotrys chartarum*. *J Asthma*. 2000 Apr;37(2):191-8.
22. Taskinen T, Hyvarinen A, Meklin T. Asthma and respiratory infections in school children with special reference to moisture and mold problems in the school. *Acta Paediatr* 1999;88:1373-1379.
23. Fung F, Hugson WG Health effects of indoor fungal bioaerosol exposure. *Appl Occup Environ Hyg* 2003 Jul;18(7):535-44
24. Terr AI. Are indoor molds causing a new disease?. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:221-226.
25. Bush R.K., Portnoy J.M., Saxon A., Abba I.T., Wood R.A The medical effects of mold exposure. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 117:326-33.
26. Bush RK, Prochnau JJ. *Alternaria*-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Feb;113(2):227-34.
27. Lopez M, Salvaggio JE. Mold-sensitive asthma. *Clin Rev Allergy* 1985; 3:183-196.
28. Gergen PJ, Turkeltaub PC, Kovar MG. The prevalence of allergic skin test reactivity to eight common aeroallergens in the US population: results from the second National Health and Nutrition Examination Survey. *J Allergy Clin Immunol* 1987; 80:669-679.
29. Eggleston PA, Rosenstreich D, Lynn H, Gergen P, Baker D, Kattan M, et al. Relationship of indoor allergen exposure to skin test sensitivity in inner-city children with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 102:563-570.
30. D'Amato G, Chatzigeorgiou G, Corsico R, Gioulekas D, Jager L, Jager S, et al. Evaluation of the prevalence of skin prick test positivity to *Alternaria* and *Cladosporium* in patients with suspected respiratory allergy: a European multicenter study promoted by the Subcommittee on Aerobiology and Environmental Aspects of Inhalant Allergens of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 1997; 52:711-716.
31. Floyer J. Violent asthma after visiting a wine cellar: a treatise on asthma, Innys and Parker, London 1745.
32. Bruce CA, Norman PS, Rosenthal RR, Lichtenstein LM. The role of ragweed pollen in autumnal asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1977, 59:449-459.
33. Henderson FW, Henry MM, Ivins SS, Morris R, Neebe EC, Leu SY, et al. Correlates of recurrent wheezing in school-age children: the physicians of Raleigh Pediatric Associates. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:1786-1793.
34. Delfino RJ, Coate BD, Zeiger RS, Seltzer JM, Street DH, Koutrakis P. Daily asthma severity in relation to personal ozone exposure and outdoor fungal spores. *Am J Respir Crit Care Med* 1996, 154:633-641.
35. Dales RE, Cakmak S, Burnett RT, Judek S, Coates F, Brook JR. Influence of ambient fungal spores on emergency visits for asthma to a regional children's hospital. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:2087-2090.
36. Dales et al. The role of fungal spores in thunderstorm asthma" *Chest* 2003; 123 (3): 745-50
37. O'Hollaren MT, Yunginger JW, Offord KP, Somers MJ, O'Connell EJ, Ballard DJ, et al. Exposure to an aeroallergen as a possible precipitating factor in respiratory arrest in young patients with asthma. *N Engl J Med* 1991;324:359-363.
38. Neukirch C, Henry C, Leynaert B, Liard R, Bousquet J, Neukirch F. Is sensitization to *Alternaria alternata* a risk factor for severe asthma? a population-based study. *J Allergy Clin Immunol* 199, 103:709-711.
39. Black PN, Udy AA, Brodie SM. Sensitivity to fungal allergens is a risk factor for life-threatening asthma. *Allergy* 2000, 55:501-504.
40. Downs SH, Mitakakis TZ, Marks GB, Car NG, Belousova EG, Leuppi JD, et al. Clinical importance of *Alternaria* exposure in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:455-459.

41. Targonski PV, Persky VW, Ramekrishnan V. Effect of environmental molds on risk of death from asthma during the pollen season. *J Allergy Clin Immunol* 1995, 95:955-961.
42. Davidson AC, Emberlin J, Cook AD, Venables KM. A major outbreak of asthma associated with a thunderstorm: experience of accident and emergency departments and patients' characteristics. Thames Regions Accident and Emergency Trainees Association. *BMJ* 1996;312:601-4.
43. Marks GB, Colquhoun JR, Girgis ST, Koski MH, Treloar AB, Hansen P, et al. Thunderstorm outflows preceding epidemics of asthma during spring and summer. *Thorax* 2001 56:468-71.
44. O'Driscoll BR, Hopkinson LC, Denning DW. Mold sensitization is common amongst patients with severe asthma requiring multiple hospital admissions. *BMC Pulm Med.* 2005 Feb 18;5(1):4.
45. Achatz G, Oberkofler H, Lechenauer E, Simon B, Unger A, Kandler D, Ebner C, Prillinger H, Kraft D, Breitenbach M Molecular cloning of major and minor allergens of *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum*. *Mol Immunol* 1995 Feb 32(3):213-27
46. Bush K R, Prochnau J J *Alternaria*-induced asthma. *JACI* 2004, 113: 227-234
47. Matheson MC, Abramson MJ, Dharmage SC, Forbes AB, Raven JM, Thien FC, Walters EH. Changes in indoor allergen and fungal levels predict changes in asthma activity among young adults. *Clin Exp Allergy.* 2005 Jul;35(7):907-13.
48. Chung YJ, Coates NH, Viana ME, Copeland L, Vesper SJ, Selgrade MK, Ward MD. Dose-dependent allergic responses to an extract of *Penicillium chrysogenum* in BALB/c mice. *Toxicology.* 2005 Apr 1;209(1):77-89. Epub 2005 Jan 21.
49. U.S. Department of Labor, OSHA. A brief guide to mold in the work place. Disponible su: <http://www.osha.gov/dts/shib101003.html>. Accessed December 12, 2005.
50. Surveillance for illness and injury after hurricane Katrina – New Orleans, Louisiana, September 8-25, 2005 *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005; 54: 1018-21
51. Science after Katrina. *Nature* 2005; 437:452.
52. Bousquet J., Lockey R. , Malling H.J., Allergen immunotherapy : Therapeutic vaccines for allergic diseases - A WHO position paper - *JACI* 1998,102, 4
53. Cantani A, Businco E, Maglio A. *Alternaria* allergy: a three-year controlled study in children treated with immunotherapy. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1988; 16:1-4.
54. Horst M, Hejjaoui A, Horst V, Michel FB, Bousquet J. Double-blind, placebo-controlled rush immunotherapy with a standardized *Alternaria* extract. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 85:460-472.
55. Bernardis P, Agnoletto M, Puccinelli P, Parmiani S, Pozzan M. Injective versus sublingual immunotherapy in *Alternaria tenuis* allergic patients. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1996, 6:55-62.
56. Helbling A, Reimers A. Immunotherapy in fungal allergy. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2003 Sep 3(5):447-53.
57. Serrano P, Algorta J, Martinez A, Gonzalez-Quevedo T, Velazquez E, Diaz M. Prospective safety study of immunotherapy administered in a cluster schedule. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2004 14(4):312-9.
58. Di Rienzo VD, Minelli M, Musarra A, Sambugaro R, Pecora S, Canonica WG, Passalacqua G. Post-marketing survey on the safety of sublingual immunotherapy in children below the age of 5 years. *Clin Exp Allergy.* 2005 May;35(5):560-4.