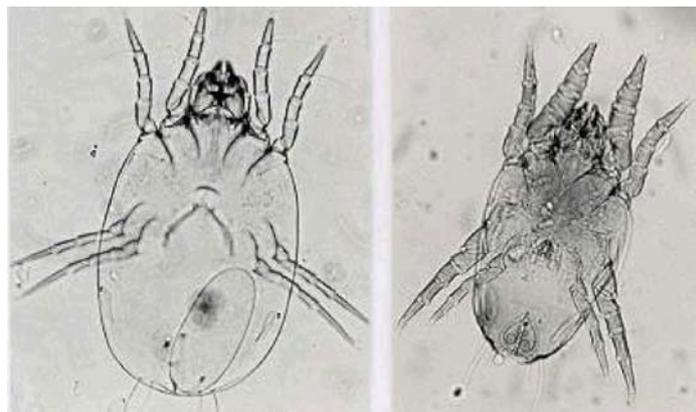


Linee Guida

ALLERGENI INDOOR NELLA POLVERE DEGLI UFFICI

CAMPIONAMENTO E ANALISI



A cura di
Liliana Frusteri
Raffaella Giovinazzo

Revisione 0 del 21 maggio 2003

INAIL

Consulenza Tecnica
Accertamento Rischi e Prevenzione

Questa pubblicazione è stata realizzata dalla Consulenza Tecnica Accertamento Rischi e Prevenzione (CON.T.A.R.P.) ad uso dei professionisti e tecnici dell'INAIL

Gruppo di lavoro INAIL :

- Barca Simona (Direzione Regionale per il Lazio, CONTARP)
- Frusteri Liliana (Direzione Generale, CONTARP)
- Giovinazzo Raffaella (Direzione Generale, CONTARP)
- Guerrera Elena (Direzione Regionale per l'Umbria, CONTARP)
- Mameli Marina (Direzione Regionale per la Toscana, CONTARP)
- Sarto Daniela (Direzione Regionale per la Liguria, CONTARP)
- Todaro Nicoletta (Direzione Generale, CONTARP)
- Novi Carlo (Direzione Regionale per la Campania, CONTARP)

Per informazioni:

INAIL - CONTARP
00143 Roma
Via Roberto Ferruzzi, 40
Tel. 06/54872349 Fax 06/54872365
e-mail: contarp@inail.it

In copertina, *Dermatophagoides pteronyssinus*, da sinistra verso destra: femmina e maschio

INDICE

<u>Premessa</u>	pag. 1
1. Introduzione	pag. 2
2. Allergeni indoor e terziario	pag. 3
3. Principali allergeni indoor	pag. 3
3.1 Acari	pag. 3
3.2 Animali domestici	pag. 4
3.3 Muffe	pag. 4
3.4 Blatte	pag. 5
4. Valori soglia	pag. 5
5. Il monitoraggio ambientale degli allergeni indoor	pag. 6
5.1 Campionamento d'aria	pag. 6
5.2 Campionamento di polvere	pag. 6
6. Valutazione qualitativa e quantitativa degli allergeni	pag. 7
6.1 Conta degli acari al microscopio ottico	pag. 7
6.2 Dosaggio della guanina	pag. 7
6.3 <i>Dustscreen</i>	pag. 8
6.4 <i>Aclotest</i>	pag. 8
6.5 Analisi immunoenzimatica mediante anticorpi monoclonali	pag. 8
7. Il protocollo adottato	pag. 9
7.1 Scelta degli ambienti	pag. 9
7.2 Raccolta della polvere	pag. 10
7.3 Estrazione degli allergeni dalla polvere e loro quantificazione	pag. 16
8. Letteratura essenziale	pag. 17
9. Elenco di alcuni siti <i>Web</i> e riviste scientifiche	pag. 20

Allegati

pag.21

- Allegato 1 - Attrezzature, materiali e reagenti
- Allegato 2 - Scheda campagna di monitoraggio
- Allegato 3 - Modulo e scheda invio campioni al Laboratorio CONTARP di Igiene Industriale
- Allegato 4 A - Protocollo di analisi per Der p 1
- Allegato 4 B - Protocollo di analisi per Der f 1
- Allegato 4 C - Protocollo di analisi per Mite Group 2
- Allegato 4 D - Protocollo di analisi per Bla g 2
- Allegato 4 E - Protocollo di analisi per Fel d 1
- Allegato 4 F - Protocollo di analisi per Asp f 1
- Allegato 4 G - Protocollo di analisi per Alt a 1

PREMESSA

L'importanza degli agenti biologici come fattori di pericolo negli ambienti di lavoro è andata sempre meglio delineandosi nel corso degli anni. In particolare, nell'ambito del rischio biologico, gli allergeni cosiddetti "indoor" hanno assunto un ruolo significativo e le patologie ad essi correlate, in forte crescita, costituiscono ormai un fenomeno di rilevanza sociale.

Il D. Lgs. 626/94 ha dedicato un intero Titolo (con Allegati) agli agenti biologici; ciò nonostante, non esistono allo stato attuale procedure standardizzate di accertamento e valutazione del rischio, né indicazioni ufficiali relative ai livelli di esposizione accettabili ai fini sanitari.

La presente Linea Guida è dedicata alle problematiche relative al campionamento e all'analisi degli allergeni indoor ed ha lo scopo dichiarato di aiutare e indirizzare verso una metodologia il più possibile omogenea coloro che saranno chiamati ad eseguire accertamenti negli uffici.

Uberto Verdel

Coordinatore Generale della CONTARP

1. INTRODUZIONE

In ambito occupazionale, l'identificazione di una relazione "dose-risposta" costituisce spesso una premessa fondamentale per la valutazione del rischio e la prevenzione delle tecnopatie. Tuttavia, a differenza di quanto avviene con il rischio di natura chimica, per gli agenti biologici non esistono limiti di esposizione utilizzabili con funzioni di valori soglia.

Per gli allergeni *indoor*, oltre alla difficoltà di stabilire dei valori soglia per la sensibilizzazione o lo scatenamento di una sintomatologia acuta, si aggiunge la difficoltà di procedere ad un'adeguata valutazione del rischio, dal momento che attualmente non esiste un consenso unanime sulle modalità di campionamento e sulle tecniche di analisi da adottare.

Ciò premesso e ai fini della valutazione del rischio, risulta necessario approfondire le problematiche relative al campionamento e alle tecniche relative al dosaggio degli allergeni al fine di stabilire criteri analitici rigorosi. In tale contesto e da tale esigenza, la Consulenza Tecnica Accertamento Rischi e Prevenzione dell'INAIL (CONTARP) ha avviato nel 2001 un progetto mirato allo studio delle diverse problematiche relative al monitoraggio degli allergeni di origine biologica negli ambienti di lavoro confinati (c.d. *indoor*), in particolare negli uffici.

Il D.Lgs. 626/1994 (art. 1) ha, infatti, esteso il campo di applicazione delle norme di sicurezza e igiene a tale tipologia di ambiente di lavoro, peraltro molto simile agli ambienti domestici, dove la problematica degli allergeni *indoor* è stata già da tempo investigata ed è, quindi, maggiormente nota, come testimonia l'abbondante letteratura scientifica in materia.

Al fine di avere una conoscenza più ampia del problema e adottare in ambito INAIL criteri e metodiche uniformi per il campionamento e l'analisi degli allergeni *indoor*, la CONTARP Direzione Generale ha costituito un gruppo di lavoro, che prevede la partecipazione delle CONTARP delle Direzioni Regionali per la Campania, il Lazio, la Liguria, la Toscana e l'Umbria, con la collaborazione del Laboratorio di Immunologia dell'Istituto Superiore di Sanità di Roma.

La presente Linea Guida intende rappresentare il prodotto dell'attività finora svolta nell'ambito del progetto sopra menzionato e vuole fornire uno strumento utile a coloro che, in ambito INAIL, desiderano accostarsi all'argomento, attivando campagne di monitoraggio degli allergeni *indoor* sul territorio. Sarebbe auspicabile l'adozione di procedure e dotazioni strumentali uniformi al fine di costituire una banca dati rappresentativa a livello nazionale della problematica inerente gli allergeni *indoor*.

A conclusione della presente Linea Guida, si riporta un elenco di siti *web* e di riviste scientifiche di possibile interesse e utilità sull'argomento.

2. ALLERGENI *INDOOR* E TERZIARIO

Gli ambienti compresi nel termine *indoor*, come riportato nelle Linee Guida per la Tutela e la Promozione della Salute negli Ambienti Confinati del Ministero della Salute (2001), comprendono le abitazioni, gli uffici, i mezzi di trasporto e le strutture comunitarie destinate a diverse attività (scuole, palestre, alberghi, bar, cinema, ristoranti, ospedali, ecc.).

In tali ambienti possono essere riscontrati inquinanti *indoor* di diversa natura, tra i quali gli allergeni. Tra le fonti più importanti di allergeni troviamo: acari, derivati di animali domestici, muffe, insetti, pollini provenienti dall'esterno, roditori.

Tra i principali fattori che influenzano la tipologia e le caratteristiche degli uffici, importanti anche ai fini della salubrità ambientale, si annoverano la struttura dell'edificio, la tipologia del mobilio, i prodotti usati per le pulizie, il numero di occupanti, le attività lavorative svolte dagli stessi impiegati. Questi ultimi, tra l'altro, trascorrono circa un terzo della loro giornata in tali ambienti.

Le implicazioni per la salute da parte di contaminazioni di natura biologica, chimica e fisica, hanno richiamato l'esigenza di studiare e stabilire dei livelli soglia di esposizione in grado di garantire un ambiente salubre.

3. PRINCIPALI ALLERGENI *INDOOR*

La nomenclatura degli allergeni raccomandata dall'OMS è la seguente: le prime tre lettere indicano il genere della specie animale o vegetale che ne costituisce la sorgente; la quarta lettera indica l'iniziale del nome della specie; segue uno spazio e un numero, che indica l'ordine cronologico della purificazione dell'allergene in questione (Tab. 1). Ad esempio, il primo allergene purificato dell'acaro appartenente alla specie *Dermatophagoides pteronyssinus* è stato denominato "Der p 1".

Tab. 1 Denominazione di alcuni tra i più comuni allergeni *indoor*

Der p 1, Der p 2	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
Der f 1, Der f 2	<i>Dermatophagoides farinae</i>
Fel d 1	<i>Felis domesticus</i>
Bla g 2	<i>Blattella germanica</i>
Alt a 1	<i>Alternaria alternata</i>
Asp f 1	<i>Aspergillus fumigatus</i>

3.1 ACARI

Gli acari sono piccoli artropodi appartenenti alla famiglia *Arachnida*. Sono lunghi circa 300µm e si nutrono di scaglie epidermiche, residui di cibo o muffe presenti nella polvere domestica.

Poiché assorbono vapore acqueo, la loro sopravvivenza dipende essenzialmente dall'umidità assoluta. La sopravvivenza allo stadio adulto richiede condizioni di umidità ambientale non più basse di $7-8\text{g/m}^3$, che equivalgono ad una umidità relativa di circa 50% a 20°C.

Gli acari più comunemente riscontrati in ambienti *indoor*, come abitazioni, uffici, scuole, ospedali, locali pubblici, appartengono al genere *Dermatophagoides*, le cui specie più diffuse in Italia sono *D. farinae* e *D. pteronyssinus*; altre specie piuttosto comuni sono: *Euroglyphus maynei*, *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Glycyphagus domesticus*. Sebbene riscontrate anche nei locali sopra citati, tali specie prediligono ambienti ricchi di derrate alimentari (da cui il nome di "acari delle derrate"), quali magazzini di stoccaggio, silos, fornai, supermercati, ecc.

Gli allergeni degli acari sono contenuti nel corpo e nelle feci di tali animali, e sono responsabili di patologie allergiche quali asma bronchiale e rino-congiuntiviti. Gli allergeni del c.d. "gruppo 1" (Der p 1 e Der f 1) vengono estratti essenzialmente dalle feci, mentre quelli del "gruppo 2" (Der p 2 e Der f 2) sono presenti soprattutto nel corpo degli acari.

3.2 ANIMALI DOMESTICI

Gli animali domestici rappresentano un'importante fonte di allergeni. Questi ultimi sono associati a peli, saliva, forfora e urina, soprattutto di gatti e cani.

Tra gli allergeni provenienti da animali domestici, sicuramente un ruolo di primo piano nelle patologie allergiche è svolto da Fel d 1, l'allergene più potente del gatto.

Localizzato soprattutto sul pelo e in misura minore nella saliva, l'allergene del gatto è associato a particelle molto piccole (circa $2,5\mu\text{m}$), rimane attaccato ai vestiti, può essere trasportato facilmente da un ambiente all'altro e permane a lungo in una stanza anche in assenza dell'animale.

L'allergene del gatto provoca asma, rinocongiuntivite e patologie cutanee.

In uffici o altri ambienti chiusi di lavoro in cui è presente un proprietario di gatto si possono, quindi, raggiungere livelli di allergeni tali da provocare attacchi di asma in soggetti allergici.

3.3 MUFFE

Le muffe comprendono numerosissime varietà di specie, che vivono generalmente su composti organici, sia all'interno che all'esterno delle abitazioni e la cui presenza è associata ad ambienti particolarmente umidi.

All'interno delle abitazioni si trovano su pareti e pavimenti, sulle foglie di piante ornamentali, nei sistemi di condizionamento dell'aria, negli umidificatori, su alimenti non adeguatamente conservati, su tessuti naturali.

Gli ambienti di lavoro in cui più comunemente vengono riscontrate sono: caseifici, salumifici, cartiere, stalle, silos, magazzini, vivai, serre; tuttavia, anche in abitazioni, comunità o uffici, la presenza di muffe può raggiungere livelli elevati.

I funghi producono spore o conidi per la loro riproduzione. Le spore sono generalmente oblunghe ed hanno una lunghezza di circa $2\div 20\mu\text{m}$. L'inalazione di spore fungine può determinare la comparsa di patologie allergiche.

Tra le muffe più allergizzanti vanno ricordati i generi: *Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*. Sebbene la presenza di *Aspergillus fumigatus* desti particolare attenzione in quanto responsabile di diverse patologie tra cui l'aspergillosi polmonare, il suo allergene maggiore, Asp f 1, raramente si riscontra in ambienti *indoor*; molto più diffusa risulta essere *Alternaria alternata*, responsabile di gravi forme di asma bronchiale.

3.4 BLATTE

Anche le blatte rappresentano una significativa fonte di allergeni, soprattutto negli edifici con scarso livello igienico. In Italia, le specie più comunemente riscontrate negli ambienti *indoor* sono *Blattella germanica*, segnalata spesso quale fonte di infestazione domestica, *Periplaneta americana*, che predilige grandi magazzini e depositi di derrate, *Blatta orientalis*, frequentemente riscontrata in luoghi più freschi come gli scantinati. Il fenomeno della sensibilizzazione nei confronti delle blatte in Italia è ancora in fase di valutazione e la maggior parte dei dati proviene da studi svolti in altri Paesi europei o negli Stati Uniti.

Gli allergeni delle blatte sono stati estratti da corpo, saliva e feci.

Anche le blatte sono ritenute responsabili di asma bronchiale.

4. VALORI SOGLIA

Relativamente agli allergeni acaridici, nel corso delle tre edizioni dell'*International Workshop on Indoor Allergens and Asthma* sono stati proposti, quali valori teorici soglia per la sensibilizzazione e per l'insorgenza di attacchi acuti di asma, rispettivamente $2\mu\text{g}$ e $10\mu\text{g}$ di allergene del gruppo 1 per grammo di polvere. Precedentemente, quali valori soglia venivano invece considerati rispettivamente 100 e 500 acari/g di polvere.

Se sulla correlazione tra esposizione ad allergeni e sensibilizzazione c'è una certa unanimità di consensi, il rapporto tra esposizione e manifestazioni acute di asma è molto più complesso. Molti pazienti con asma sono esposti e sensibilizzati nei confronti di più allergeni *indoor* ed è difficile definire il contributo di ciascuno di essi nello scatenamento di una sintomatologia acuta.

Per gli altri allergeni non esistono livelli soglia ben definiti, ma per Fel d 1 sono stati suggeriti come importanti per la sensibilizzazione, i valori compresi tra 2 e $8\mu\text{g/g}$ di polvere e, per lo sviluppo di attacchi acuti di asma, quelli superiori a $8\mu\text{g/g}$ di polvere.

5. IL MONITORAGGIO AMBIENTALE DEGLI ALLERGENI *INDOOR*

Il monitoraggio degli allergeni *indoor* può essere effettuato sia mediante la raccolta delle polveri sedimentate, sia mediante il campionamento del particolato aerodisperso. Sulla base della metodologia adottata si ottengono indici di esposizione esprimibili, rispettivamente, in termini di μg di allergene per grammo di polvere ($\mu\text{g}/\text{g}$) o μg di allergene per m^3 di aria ($\mu\text{g}/\text{m}^3$).

Il monitoraggio ambientale dovrebbe essere effettuato considerando le caratteristiche delle particelle di polvere veicolanti gli allergeni stessi. La persistenza degli allergeni nella frazione inalabile varia, infatti, in funzione sia della forma e delle dimensioni delle particelle in cui essi sono contenuti ($10 \div 40 \mu\text{m}$ per acari e blatte, inferiori ai $5 \mu\text{m}$ per gatto e cane) sia della turbolenza dell'aria, per cui gli allergeni rimangono in sospensione per un periodo di tempo differente: tendono a depositarsi velocemente quelli da acari e da blatte e a rimanere maggiormente sospesi quelli da gatto o cane.

5.1 CAMPIONAMENTO D'ARIA

Esistono diverse tecniche per il campionamento volumetrico degli allergeni aerodispersi: impattori a cascata, campionatori a basso o alto volume con membrane filtranti. Queste tecniche, rispetto alla raccolta della polvere sedimentata, hanno il vantaggio che campionano allergeni aerodispersi, più rappresentativi della reale esposizione. Risultano sicuramente più idonee a valutare l'esposizione ad allergeni provenienti da animali domestici, ma ancora pochi sono gli studi che consentono di valutarne la validità. Inoltre, negli ambienti nei quali non si verificano spostamenti d'aria, le quantità di aeroallergeni dispersi sono troppo piccole e difficili da rilevare anche dopo prolungati campionamenti (ad esempio, poche sono le particelle fecali acaridiche che rimangono in sospensione dopo fenomeni di turbolenze d'aria).

I particolari svantaggi del campionamento aereo sono dovuti ai lunghi tempi necessari (2-24 ore) e alla richiesta di sistemi di analisi estremamente sensibili.

Attualmente, non esistono informazioni tali da supportare l'adozione di un metodo standardizzato di campionamento dell'aria per gli allergeni acaridici. Inoltre, ci sono pochissimi dati sulla correlazione tra livelli aerei degli allergeni e sensibilizzazione o sintomatologia acuta. Al contrario, una certa relazione è stata provata tra la concentrazione degli allergeni nella polvere e sensibilizzazione.

5.2 CAMPIONAMENTO DI POLVERE

In letteratura, finora, il metodo più utilizzato è quello della raccolta delle polveri su superficie, che può essere effettuata secondo modalità diverse, con grande influenza sui risultati finali. E' importante, dunque, scegliere la procedura in base allo scopo prefissato, che può essere, ad

esempio, lo studio della qualità allergenica della polvere (molto utile nel valutare il rischio in un determinato ambiente) o l'esposizione totale agli allergeni. Nel primo caso l'analisi viene standardizzata per unità di peso e i risultati espressi come μg di allergene/g di polvere; nel secondo caso, viene standardizzata per unità di superficie e tempo, ed espressa in termini di μg o ng di allergene/ m^2 /minuto. Negli studi epidemiologici sembra più idoneo esprimere il dato in termini di unità di peso/g di polvere; nel caso, invece, si vogliono verificare i risultati di determinati programmi di controllo, appare più opportuno esprimersi in termini di μg per unità di superficie. Esprimere i risultati per unità di peso/g di polvere rende più facile la standardizzazione e il confronto tra siti differenti. Tra l'altro, è stata anche dimostrata una buona correlazione tra risultati espressi in $\mu\text{g}/\text{g}$ o in $\mu\text{g}/\text{m}^2$

In quanto ai campionatori di polvere, ci si può avvalere di aspirapolveri equipaggiati di sacchetti-filtro sostituiti di volta in volta tra un campionamento e l'altro, o di speciali "dust-trap", ricettacoli per la polvere provvisti di filtri.

6. VALUTAZIONE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DEGLI ALLERGENI

I test più riproducibili e specifici per la misurazione degli allergeni *indoor*, sono quelli che si avvalgono dell'uso di anticorpi monoclonali e consentono di effettuare un'analisi sia qualitativa che quantitativa. Altri metodi usati, in particolare per gli acari, sono: conta al microscopio ottico; dosaggio della guanina; analisi semiquantitativa con anticorpi mono o policlonali (*Dustscreen, Aclotest*, ecc.).

6.1 CONTA DEGLI ACARI AL MICROSCOPIO OTTICO

La presenza degli acari nella polvere sedimentata può essere determinata contando gli stessi al microscopio ottico dopo averli estratti da essa e montati su vetrino. Questa tecnica permette l'identificazione delle specie predominanti e dei loro diversi stadi di sviluppo.

Gli svantaggi di questo metodo sono:

- necessità di disporre di personale esperto nel riconoscere le differenti specie;
- impossibilità di identificare le particelle fecali responsabili delle principali reazioni allergeniche e i corpi degli acari danneggiati;
- impossibilità di adottare tali protocolli per studi su larga scala, essendo gli stessi piuttosto lunghi.

6.2 DOSAGGIO DELLA GUANINA

Tale analisi consente solo una valutazione semiquantitativa della qualità allergenica della polvere ed è alquanto aspecifica. La guanina è infatti contenuta nelle feci degli Aracnidi in generale.

6.3 DUSTSCREEN

Il protocollo previsto dal *Dustscreen* (CMG-HESKA, Fribourg, Switzerland) si avvale di strisce di nitrocellulosa su cui sono adsorbiti anticorpi monoclonali specifici per gli allergeni Der p 1, Der f 1, Mite Group 2, Bla g 2, Fel d 1. Ciascuna striscia contiene cinque aree colorate specifiche per ciascun allergene, un controllo negativo (assenza di contaminazione allergenica) ed un controllo positivo (presenza di contaminazione).

Il procedimento è essenzialmente il seguente:

- estrazione degli allergeni dalla polvere mediante un tampone a base di bicarbonato d'ammonio;
- incubazione delle strisce di nitrocellulosa con 1ml di estratto;
- lavaggi;
- incubazione con una miscela contenente anticorpi monoclonali marcati con l'enzima perossidasi;
- lavaggi;
- incubazione con cromogeno e substrato di reazione per la rivelazione colorimetrica della concentrazione di allergene presente.

La durata complessiva del test è di poco più di quattro ore. Le strisce di nitrocellulosa sono lette al densitometro. I risultati sono resi quantitativi mediante il confronto con soluzioni standard di riferimento a concentrazione nota degli allergeni, che consentono di trasformare i valori di assorbimento ottico in concentrazioni di allergene misurato.

6.4 ACLOTEST

L'*Aclotest* (Lofarma, Milano) è un test per acari che si avvale dell'uso di anticorpi policlonali di coniglio per la cattura dell'allergene e anticorpi policlonali purificati, coniugati ad un colorante colloidale (Samaron Brilliant Pink) per la rivelazione. I risultati sono dati come negativi, in caso di assenza di colorazione, debolmente positivi, nel caso di lieve colorazione rosa (corrispondente ad una concentrazione allergenica compresa tra 0,5 e 2µg/g), fortemente positivi, se la colorazione rosa è intensa (concentrazione allergenica >2µg/g).

6.5 ANALISI IMMUNOENZIMATICA MEDIANTE ANTICORPI MONOCLONALI

Sono disponibili sistemi immunoenzimatici che consentono la misurazione di diversi allergeni *indoor* quali: Der p 1, Der f 1, Mite Group 2, Fel d 1, Can f 1, Bla g 2, Asp f 1, Alt a 1. Nella maggioranza dei casi, viene usato un anticorpo monoclonale (mAb) per la cattura degli allergeni ed un secondo mAb, biotinilato o marcato con un enzima, per la rivelazione dell'allergene. Quando è disponibile un solo mAb, per la rivelazione vengono utilizzati anticorpi policlonali di coniglio (come avviene nei kit analitici per Can f 1, Bla g 1, Bla g 2, Asp f 1).

7. IL PROTOCOLLO ADOTTATO

Ad oggi, per le problematiche precedentemente espresse, non esistono procedure standardizzate per il campionamento e l'analisi degli allergeni indoor. Tuttavia, sulla scorta di quanto riscontrato nella letteratura scientifica internazionale e della disponibilità commerciale di specifici reagenti, la CONTARP ha messo a punto e adottato un protocollo che prevede la raccolta della polvere sedimentata sulle superfici degli ambienti di lavoro e l'analisi della stessa mediante l'uso di anticorpi monoclonali, come di seguito descritto.

Nell'Allegato 1 si riporta l'elenco delle attrezzature e dei reagenti previsti dal protocollo.

7.1 SCELTA DEGLI AMBIENTI

Nel caso in cui si voglia impostare uno studio sull'analisi qualitativa e quantitativa degli allergeni *indoor* negli uffici, è preferibile selezionare in essi tipologie diverse di stanze, in modo da poter confrontare tra loro condizioni differenti che potrebbero influenzare la concentrazione allergenica quali, ad esempio, la presenza o meno di impiegati, l'eventuale frequentazione da parte del pubblico, il tipo di impianto di riscaldamento/condizionamento presente, ecc.

Il protocollo di indagine ha previsto, pertanto, la selezione delle seguenti tipologie di ambiente:

- stanza con 1 impiegato
- stanza con più impiegati (ove maggiore è il calpestio e l'accumulo di detriti organici)
- archivio cartaceo (ove si suppone sia notevole l'accumulo di polvere, ma generalmente privo di una presenza fissa di impiegati)
- stanza aperta al pubblico (ove il calpestio e l'afflusso di persone è massimo).

In ognuno di tali ambienti, il campionamento è stato effettuato a livello di due siti fondamentali:

- la postazione del lavoratore, cioè il raggio di azione di questo;
- l'angolo della stanza più distante dalle finestre (ove si suppone sia maggiore l'accumulo di polvere).

Sono state effettuate due campagne annuali di prelievi di polvere - una estiva e una autunnale - onde studiare l'eventuale variabilità stagionale della concentrazione degli allergeni nella polvere, soprattutto di acari e muffe. Il monitoraggio, pertanto, va programmato in funzione delle condizioni microclimatiche ed ambientali della struttura da studiare.

Nel caso in cui lo studio implichi il confronto tra diversi edifici, i prelievi devono essere effettuati in parallelo o, comunque, nel più breve intervallo di tempo possibile l'uno dall'altro.

I prelievi della polvere devono essere corredati dalla raccolta di informazioni relative agli ambienti di lavoro sottoposti a monitoraggio, agli eventuali disagi percepiti dai lavoratori e alle patologie allergiche cui gli stessi possono essere affetti. A tal fine, è stato elaborato un modello di scheda per la raccolta dei dati, nel quale sono stati inseriti i campi relativi alle principali voci o informazioni di possibile interesse ai fini dello studio (Allegato 2).

7.2 RACCOLTA DELLA POLVERE

Preliminarmente al campionamento, è necessario numerare o identificare il contenitore con il filtro ed eseguirne la pesata (Fig. 1), annotando il valore della tara su un apposito registro-campioni.



Figura 1. Pesata dei contenitori con i filtri

Per effettuare il campionamento, i filtri vanno rimossi dai contenitori e inseriti nei rispettivi beccucci (Figg. 2 e 3), a loro volta montati in testa del tubo dell'aspirapolvere (Fig. 4).



Figura 2. Beccucci adattatori



Figura 3. Inserimento dei filtri nei beccucci adattatori



Figura 4. Inserimento dei beccucci adattatori nel tubo dell'aspirapolvere

E' consigliabile che, nel corso di tali operazioni e durante il prelievo stesso, l'operatore indossi camice, guanti e, qualora l'ambiente sia molto polveroso, anche la mascherina.

Per quanto attiene alla regolazione del flusso di aspirazione della polvere, si consiglia di standardizzare la scelta della velocità da adottare: 27 L/min., se l'aspirazione viene effettuata sul pavimento e sulle superfici di lavoro, mentre per le superfici in tessuto (sedie) o la moquette è consigliabile adottare un flusso di 25 L/min.

L'aspirazione deve rigorosamente essere standardizzata anche per quanto riguarda sia la durata del prelievo che la superficie interessata, assicurandosi che non sia stata effettuata la pulizia degli ambienti poche ore prima del prelievo stesso. Inoltre, bisogna assicurare il giusto contatto del beccuccio adattatore sulla superficie su cui si sta campionando (Fig. 5).



Figura 5. Posizionamento del beccuccio durante l'aspirazione

Il protocollo di campionamento prevede, per ogni ambiente, aspirazioni di polvere della **durata totale di 2 minuti** e su una superficie totale pari a **4 fogli formato A4** (corrispondente a 0,25 m²).

Nel dettaglio si consiglia di effettuare:

1. n.2 prelievi per ogni stanza, uno a livello della postazione di lavoro e uno a livello dell'angolo della stanza più lontano dalla finestra (Fig. 6).

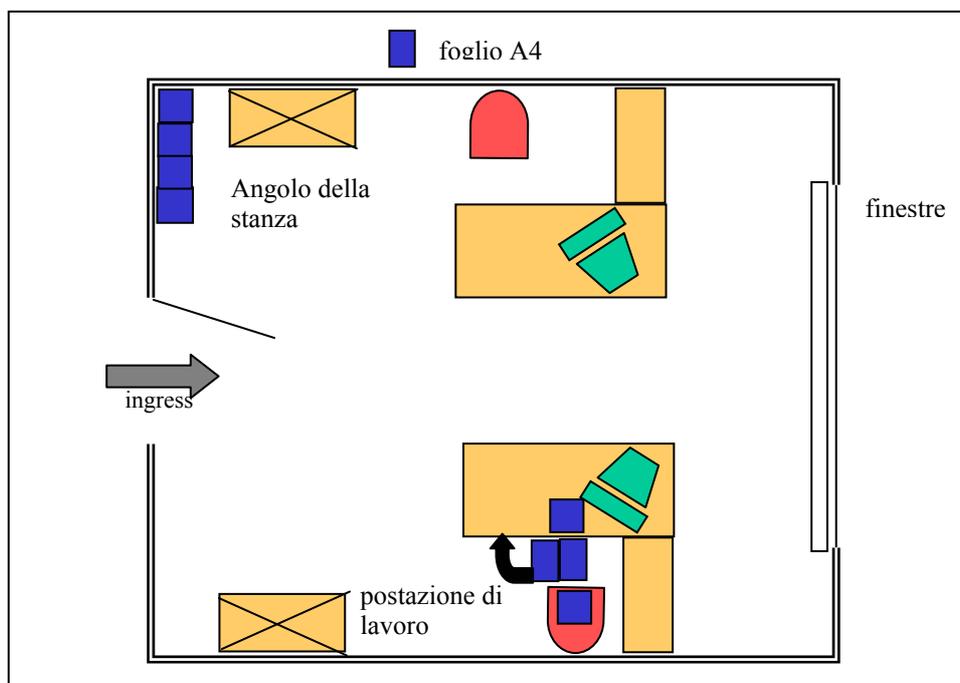


Figura 6. Punti di campionamento.

In considerazione delle diverse condizioni di arredo possibili, la scelta della superficie angolare da interessare all'aspirazione può essere condotta nel modo indicato in Fig. 7.

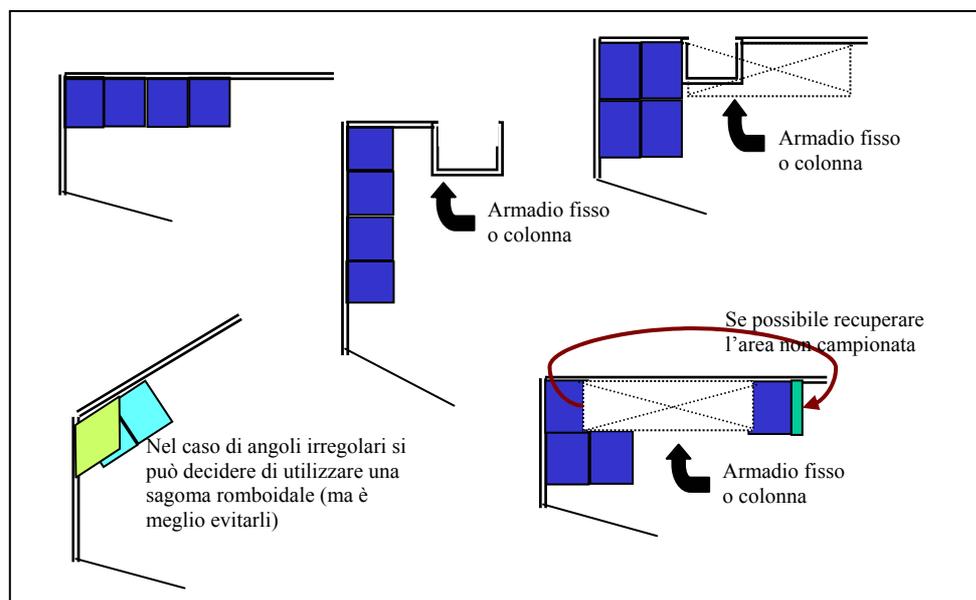


Figura 7. Disposizione dell'area di campionamento

A livello della postazione, 30 secondi di aspirazione sul piano della scrivania, su una superficie pari a 1 foglio A4; 30 secondi sulla sedia del lavoratore, su una superficie pari a 1 foglio A4; 30 secondi x 2 volte (una per ogni foglio A4) sul pavimento sotto il piano della scrivania, su una superficie totale pari a 2 fogli A4 (Figg. 8-10). A livello dell'angolo della stanza, 2 minuti su una superficie pari a 4 fogli A4.



Figura 8. Aspirazione della polvere dalla postazione dell'impiegato (scrivania)



Figura 9. Aspirazione della polvere dalla postazione dell'impiegato (sedia)



Figura 10. Aspirazione della polvere dalla postazione dell'impiegato (pavimento)

Effettuata l'aspirazione, si procede al distacco del beccuccio dal tubo dell'aspirapolvere e alla rimozione del filtro di teflon in esso contenuto (Fig. 11). Nel caso in cui la quantità di polvere raccolta fosse insufficiente (vd. punto 4), si dovrebbe procedere ad un nuovo prelievo, effettuando un'aspirazione *random* all'interno della stanza e per un tempo massimo di 5 minuti.

2. Si ripone il filtro con la polvere nell'apposita custodia di plastica (Fig. 12), che si conserva poi a + 4°C in borsa-frigo con panetti refrigeranti per il trasporto in laboratorio, ove si stocca a -20°C fino al momento dell'analisi.



Figura 11. Rimozione del filtro con la polvere dal beccuccio



Figura 12. Inserimento del filtro con la polvere nell'apposita custodia

Le condizioni di trasporto dei campioni da inviare al Laboratorio di Igiene Industriale della CONTARP Centrale devono essere tali da assicurare il rigoroso rispetto della temperatura di conservazione e tempi di consegna più brevi possibili. La modulistica di accompagnamento è riportata in Allegato 3.

3. Nel caso debba essere effettuato un nuovo prelievo, si procede alla sostituzione del beccuccio con un altro pulito, in cui si inserisce un nuovo filtro.

4. Prima di stoccare i campioni, è necessario pesare le custodie contenenti i filtri e la polvere e riportare sull'apposito registro il peso della polvere raccolta. Una quantità ottimale di polvere, così come richiesto dalla metodica adottata, dovrebbe essere di **50-100mg**.

I beccucci adattatori possono essere lavati con detergenti comunemente impiegati in laboratorio ed essere riutilizzati.

7.3 ESTRAZIONE DEGLI ALLERGENI E LORO QUANTIFICAZIONE

Si prelevano 100mg di polvere dal campione in esame e si immettono in una microprovetta da 2ml; a questa si aggiungono 2.0ml di PBS-T (una soluzione allo 0.05% di Tween 20). Nel caso in cui il campione di polvere prelevato contenga meno di 50mg di polvere, aggiungere 1ml di PBS-T; se ne contiene tra 50 e 100mg, una quantità proporzionale al peso.

Una volta miscelata la soluzione, usando il vortex, questa viene posta per 2 ore a temperatura ambiente su un piatto rotante oppure a 4°C per tutta la notte. Terminata l'incubazione, si procede alla centrifugazione per 20 minuti a 2500 rpm, a 4°C. Si raccoglie il surnatante estratto mentre si scarta il pellet. Se l'estratto non è utilizzato subito per l'analisi immunoenzimatica, si può conservare a -20°C.

Attualmente, il protocollo di analisi adottato dal gruppo di lavoro INAIL/ISS è quello proposto dalla *Indoor Biotechnologies* (UK), che consiste nell'utilizzo di anticorpi monoclonali (uno per ogni tipo di allergene) insieme a soluzioni standard di allergeni a concentrazione nota (Allegati 4A÷G).

Ringraziamenti

Il Gruppo di Lavoro desidera ringraziare il Laboratorio di Immunologia dell'Istituto Superiore di Sanità per la collaborazione offerta per l'estrazione e il dosaggio degli allergeni dalla polvere.

8. LETTERATURA ESSENZIALE

1. Almqvist C, Larsson MD, Egmar AC *et al.* (1999). School as a risk environment for children allergic to cats and a site for transfer of cat allergen to homes. *J Allergy Clin Immunol* 103(6): 1012-1017.
2. Baur X, Chen Z, Liebers V (1998). Exposure-response relationships of occupational inhalative allergens. *Clin Exp Allergy* 28: 537-544
3. Bigliocchi F, Maroli M (1995). Distribution and abundance of house dust mites (Acarina: Pyroglyphidae) in Rome, Italy. *Aerobiologia* 11: 35-40.
4. Bigliocchi F, Frusteri L, Carrieri MP, Maroli M (1996). Distribution and density of house dust mites *Dermatophagoides* spp (Acarina: Pyroglyphidae) in the mattresses of two areas of Rome, Italy. *Parassitologia* 38: 543-546
5. Carrer P, Maroni M, Alcini D, Cavallo D (2001). Allergens in indoor air: environmental assessment and health effects. *Sci Tot Environ* 270: 33-42.
6. Castagnoli M, Liguori M, Nannelli N (1983). Gli acari della polvere delle case in Italia. Atti XIII del Congresso Nazionale Italiano di Entomologia. Sestriere, 27 giugno-1 luglio 1983: 577-582.
7. Chapman MD (1993). Cockroach allergens: a common cause of asthma in North American cities. *Insights in Allergy* 8: 1-8.
8. Colloff MJ, Spieksma FTHM (1992). Pictorial keys for the identification of domestic mites. *Clin Exp Allergy* 22: 823-830.
9. Colloff MJ (1991). Practical and Theoretical aspects of the ecology of house dust mites (Acari: Pyroglyphidae) in relation to the study of mite-mediated allergy. *Rew Med Vet Entomol* 79(11/12): 611-629.
10. Custovic A, Taggart SCO, Woodcock A (1994). House Dust Mite and cat allergen in different indoor environments. *Clin Exp Allergy* 24: 1164-1168.
11. Custovic A, Green R, Taggart SCO, Smith A, Pickering CAC, Chapman MD, Woodcock A (1996). Domestic allergens in public places II: dog (Can f 1) and cockroach (Bla g 2) allergens in dust and mite, cat, dog and cockroach allergens in the air of public buildings. *Clin Exp Allergy* 26: 1946-1952.
12. Custovic A, Fletcher A, Pickering AC *et al.* (1998). Domestic allergens in public places III: house dust mite, cat, dog and cockroach allergen in Britain hospitals. *Clin Exp Allergy* 28: 53-59.
13. Custovic A, Chapman M (1998). Risk levels for mite allergens. Are they meaningful? *Allergy* 53(48): 71-76.

14. De Weck AL, Derer M, Morrison-Smith G, Stadler BM, Walliser M (1998). Dustscreen, a new assay for simultaneous determination of multiple allergens in house dust. *ACI International* 10(5): 130-140.
15. Fain A, Guerin B, Hart BJ (1990). Mites and allergic disease. Ed. Guerin: 190 pp.
16. Frusteri L, Giannetto S, Maroli M (1998). Distribution of house dust mites in the mattresses in Messina Province, Italy. *Parassitologia* 40(suppl.1): 57.
17. Frusteri L, Giovinazzo R, Iacovacci P, Anzidei P, Barca S, Guerrera E, Mameli M, Sarto D, Todaro N, Venanzetti F, Di Felice G, Pini C (2002). Allergeni indoor negli uffici: risultati preliminari di uno studio svolto in alcune Regioni italiane. Atti del 20° Congresso Nazionale AIDII, Viterbo 19-21 giugno 2002.
18. Janko M, Gould DC, Vance L, Stengel CC, Flack J (1995). Dust mite allergens in the office environment. *Am Ind Hyg Assoc J* 56 (11): 1133-40.
19. Luczynska CM, Li Y, Chapman MD, Platts-Mills TAE (1990). Airborne concentration and particle size distribution of allergen derived from domestic cats (*Felis domesticus*). Measurements using cascade impactor, liquid impinger and a two-site monoclonal antibody assay for Fel d 1. *Am Rev Respir Dis* 141: 361-367.
20. Mansi A, Frusteri L., Maroli M., Salerno A., Marcelloni A.M., Muzi G., Accattoli M.P., Abbritti G. A study on house-dust mite infestation in temporary prefabricated homes after a recent earthquake in central ITALY. Proceedings of Healthy Buildings 2000, Vol. 1: 325-330.
21. Mari A, Maroli M (1996). L'allergia agli acari della polvere quale problema di igiene ambientale. *Ig San Pubbl* 52 (4): 255-262.
22. Menzies D, Comtois P, Pasztor J, Nunes F, Hanley JA (1998). Aeroallergens and work-related respiratory symptoms among office workers. *J Allergy Clin Immunol* 101(1): 38-44.
23. Mosbech H (1985). House allergy dust mite. *Allergy* 25: 119-126.
24. Moscato G, Perfetti L (1995). The role of indoor pollution on bronchial hyperreactivity and asthma. *Indoor Environment* 4: 95-101.
25. Moscato G, Perfetti L, Galdi E, Pozzi V, Minoia C (2000). House dust mite allergen levels in homes of non allergic people in Italy. *Allergy* 55: 873-878.
26. Nannelli R, Liguori M, Castagnoli M (1983). Osservazioni preliminari sulla biologia di *Euroglyphus maynei* e sua distribuzione in Italia. *Redia* LXVI: 401-408.
27. Noferi A, Serino W, Sacerdoti G, Blythe ME (1974). Survey on concentration and type of house dust mites (HDM) in dusts of specifically sensitized people in Naples. Preliminary data. *Folia Allergol Immunol Clin* 21: 466-469.
28. Ottoboni F, Morlacchi C, Falagiani P, Petrigni G (1978). Allergia agli acari domestici: studio epidemiologico ed immunochimico. *Folia Allergol Immunol Clin* 25: 592-597.

29. Ottoboni Fe Piu G (1990). Gli acari allergenici. Guida al loro riconoscimento. Ed. UTET, Milano.
30. Ottoboni F, Falagiani P, Morlacchi C, Centanni G (1979). Indagine sugli acari delle polveri di casa. *Folia Allergol Immunol Clin* 26: 427-428.
31. Perfetti L, Pozzi V, Grignani E *et al.* (1999). Concentrations of house mites (Der p 1, Der f 1), cat (Fel d 1) and cockroach (Bla g 2) allergens in offices. *Allergy* 54(suppl. 52): 84.
32. Perzanowsky MS, Ronmark E, Nold B *et al.* (1999). Relevance of allergens from cats and dogs to asthma in the northernmost province of Sweden: schools as a major site of exposure. *J All Clin Immunol* 103(6): 1018-1024.
33. Piu G, Ballero M, Palomba A *et al.* (1990). Autunno 1989: acarofauna in Sardegna. *Folia Allergol Immunol Clin* 37: 285-289.
34. Platts-Mills TAE, De Weck AL (1988). Dust mite allergens and asthma: a worldwide problem. *Int Workshop ep Bull World Health Org* 66: 769-780.
35. Platts-Mills TAE, Thomas WR, Aalberse RC (1992). Dust mite allergens and asthma: Report of the the 2nd International Workshop. *J Allergy Clin Immunol* 89: 1046-60.
36. Platts-Mills TAE, Vervoloe D, Thomas WR, Aalberse RC (1992). Indoor allergens and asthma: Report of the Third International Workshop. *J Allergy Clin Immunol* 100: S2-S24.
37. Raunio P, Pasanen AL, Reiman M, Virtanen T (1998). Cat, dog, and house-dust mite allergen levels of house dust in Finnish apartments. *Allergy* 53: 195-199.
38. Schwartz B, Lind P, Lowenstein H (1987). Level of indoor allergens in dust from homes of allergic and non-allergic individuals. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 82: 447-449.
39. SIDRIA (Italian Studies on Respiratory Disorders in Childhood and the Environment) (1997). Asthma and respiratory symptoms in 6-7 yr old Italian Children. *Eur Respir J* 10: 1780-1786.
40. S.O. alla G.U. n. 276 del 27.11.2001, Ministero della Salute. Linee Guida per la tutela e la Promozione della Salute negli Ambienti Confinati
41. Voorhost R, Spieksma FTM, Varekamp N. House dust mite atopy and the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (Troussart, 1897). Leiden: Stafleu's Scientific Publishing, 1969.
42. Wickens K, Martin I, Pearce N, *et al.* (1997). House dust mite allergen levels in public places in New Zealand. *J Allergy Clin Immunol* 99 (5): 587-593.

9. ELENCO DI ALCUNI SITI *WEB* E RIVISTE SCIENTIFICHE

<http://www.aaaai.org>

<http://www.aabronchology.org/>

<http://www.aarc.org>

<http://www.lungusa.org>

<http://www.isao.bo.cnr.it>

<http://www.eaaci.org/>

<http://www.pneumonet.it/federasma>

<http://www.pneumonet.it>

<http://www.simri.it/>

1. Aerobiologia
2. Allergy (Blackwell Munksgaard)
3. American Industrial Hygiene Association Journal (American Industrial Hygiene Association)
4. Applied Occupational and Environmental Hygiene
5. Annals of Allergy, Asthma and Immunology (ACAAI, American College of Allergy, Asthma and Immunology)
6. Clinical and Experimental Allergy (Blackwell Publishing)
7. Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia (Le Collane della Fondazione S. Maugeri)
8. Indoor Air (Blackwell Munksgaard)
9. Indoor and Built Environment (Karger, Basel)
10. International Archives of Allergy and Immunology (S. Karger, Medical and Scientific Publishers)
11. Journal of Allergy and Clinical Immunology (Kluwer Academic/Plenum Publishers)
12. La Medicina del Lavoro (Mattioli 1885, Casa Editrice)
13. Clinical Reviews in Allergy and Immunology (Human Press)
14. The Science of the Total Environment (Elsevier Science)

ALLEGATO 1**ATTREZZATURE, MATERIALI E REAGENTI****a) Campionamento:**

- Aspirapolvere portatile (1400 Watt, range flusso di aspirazione 19÷28 L/min.) con tubo di aspirazione di diametro interno compatibile con i beccucci;
- Beccucci adattatori (*Alk-Abellò*);
- Filtri in teflon e custodie in plastica (*Alk-Abellò*) per la raccolta della polvere aspirata;
- Borsa frigo e panetti refrigeranti, per il trasporto dei campioni;
- Centralina microclimatica (*Babuc/A, LSI*)

b) Analisi della polvere

Kit analitici della *Indoor Biotechnologies* (UK) per i seguenti principali allergeni indoor:

- Der p 1 ELISA kit (5H8/4C1)
- Der f 1 ELISA kit (6A8/4C1)
- Mite Group 2 ELISA(1D8/7A1)
- Fel d 1 ELISA kit (6F9/3E4)
- Bla g 2 ELISA kit (7C11/R)
- Asp f 1 ELISA kit (4A6/R)
- Alt a 1 ELISA(1G9/1G9)

c) Tamponi ed altri reagenti non presenti nei kit

- PBS (Phosphate Buffer Saline, *Sigma P4417*)
- Tween 20 (*Sigma P-1379*)
- Carbonato-bicarbonato 50mM, pH 9.6 (*Sigma C3041*)
- BSA (Bovine Serum Albumine (*Sigma A7030*))
- Streptavidina-perossidasi (*Sigma S5512*)
- ABTS 70mM, pH4.2 (*Sigma A1888*)
- Perossido d'idrogeno 30% (Fisher Chemical H 325-100)

d) Materiale vario

- Bilancia analitica
- Piastre in polistirene a 96 pozzetti per test ELISA (*Dynatech Immunolon II*)
- Micropipette e microprovette
- *Microtech Microplate Washer* (*BioRad*)
- Centrifuga
- Spettrofotometro (*BioRad, Model 550 Microplate Reader*), con filtri per lettura a $\lambda=405\text{nm}$

ALLEGATO 2

SCHEMA CAMPAGNA DI MONITORAGGIO

SCHEMA N. _____

data _____

Filtro N. _____

Edificio	
Stanza	
Tipologia stanza e n. impiegati presenti	
Tipologia arredi interni	
Pavimentazione	
Pareti	
Finestre	
Numero finestre	
Impianto condizionamento/riscaldamento	
Siti di prelievo	
<i>Parametri microclimatici</i>	
Temperatura (secca e umida) WBGT int., WBGT est., WBGT globotermometro	
Umidità relativa	
Velocità dell'aria	
Ricambi d'aria	
Note	
<i>Parametri soggettivi</i>	
Fattori di disagio ambientali	
Malattie app. resp./allergie Test diagnostici effettuati	
Disturbi accusati	
Animali domestici	
Altri fattori soggettivi	

Guida alla compilazione della scheda campagna di monitoraggio

La presente scheda deve essere compilata per ciascun ambiente in cui viene effettuato il campionamento.

La scheda si compone di tre parti:

- nel primo riquadro si deve annotare la denominazione dell'Edificio (Sede, Ente ecc) di cui fa parte l'ufficio in cui si effettuano i prelievi di polvere. Andranno raccolte, inoltre, informazioni dettagliate relative alla tipologia e ai materiali dei rivestimenti, pavimenti (ad es. marmo, mattonelle, moquette, ecc), pareti (carta da parati, legno, tinteggiature etc.), infissi (ad es. in legno, in lega leggera con o senza vetrocamera ecc.) e arredi interni (tipologia del mobilio, eventuale presenza di poltroncine etc.) degli ambienti (stanze) sottoposti a monitoraggio, specificandone i siti particolari da cui è stata raccolta la polvere (angolo della stanza, postazione di lavoro). Si dovrà annotare anche la tipologia dell'impianto di condizionamento/riscaldamento presente (ad esempio, se centralizzato o meno);
- nel secondo riquadro si devono annotare i dati microclimatici ambientali rilevati tramite centralina;
- nel terzo riquadro vanno annotate le informazioni raccolte, tramite intervista, dagli impiegati che svolgono l'attività di lavoro negli ambienti in cui è stato effettuato il campionamento (disagi connessi alle condizioni microclimatiche, eventuali patologie o disturbi accusati, presenza di animali domestici nelle abitazioni etc.).

Se in un ambiente vengono effettuati più prelievi di polvere, per ciascuno di essi deve essere specificato il corrispondente numero di identificazione del filtro (o dei filtri) con il relativo sito di prelievo.



ALLEGATO 3

MODULO E SCHEDA INVIO CAMPIONI AL LABORATORIO CON.T.A.R.P. DI IGIENE INDUSTRIALE

Rif.....

Data

**Alla CON.T.A.R.P. D.G.
Ufficio Posta
Via R. Ferruzzi, 40
00143 - Roma**

Oggetto: invio campioni al Laboratorio CON.T.A.R.P. di Igiene Industriale (Sezione Biologica)

Si trasmettono N. campioni di polvere, dettagliati nella scheda allegata e relativi a:

<u>AZIENDA (Sede):</u>	
<u>Attività:</u>	
<u>Ambiente monitorato:</u>	
<u>Allergene da ricercare:</u>	<input type="checkbox"/> Der p1 <input type="checkbox"/> Der f1 <input type="checkbox"/> Alt a1 <input type="checkbox"/> Asp f1 <input type="checkbox"/> Bla g2 <input type="checkbox"/> Fel d1 <input type="checkbox"/> Mite group2 <u>Altro:</u>
<u>Modalità di conservazione dei campioni:</u> <input type="checkbox"/> + 4°C <input type="checkbox"/> -20°C	

NOTE

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Firma

All. Nschede

Guida alla compilazione del modulo e della scheda di invio campioni

I campioni inviati al laboratorio CONTARP devono sempre essere accompagnati dal presente modulo e dalla scheda allegata.

- Il modulo deve essere compilato in tutte le sue parti, specificando pertanto:
 - la denominazione e sede dell'Azienda, Ente etc. in cui sono stati effettuati i campionamenti,
 - l'attività principale svolta,
 - la tipologia dell'ambiente sottoposto a monitoraggio (stanza con uno o più impiegati, ambiente aperto al pubblico, archivio, biblioteca, etc.),
 - la modalità di conservazione dei campioni assicurata durante il trasporto e il tipo di allergene che deve essere ricercato nei campioni di polvere, barrando le rispettive caselle.

Nel sottostante spazio (*Note*) si potranno aggiungere tutte le ulteriori informazioni che si riterranno utili o necessarie.

Il modulo deve essere firmato dal referente/responsabile dell'attività di monitoraggio e dei campionamenti.

- La scheda di invio campioni al Laboratorio, da allegare sempre al modulo, raccoglie sinteticamente alcune informazioni relative ai campioni di polvere prelevata. Nella prima colonna va riportato il numero progressivo dei campioni inviati. Per ogni campione andranno annotati, nelle successive colonne, l'identificativo (composto dalle prime tre lettere del nome della regione di provenienza dei campioni - ad es. LAZ per regione Lazio - seguite dal numero con cui si è identificata la custodia contenente il filtro con la polvere), la data del prelievo, la quantità di polvere raccolta (differenza tra il peso della custodia+filtro dopo e prima il campionamento), la mansione lavorativa svolta dall'addetto (impiegato), nel caso in cui il prelievo sia effettuato presso la postazione di lavoro dello stesso e il sito di prelievo (barrando la casella specifica corrispondente).

Ai fini della costituzione e implementazione di una banca dati rappresentativa a livello nazionale sugli allergeni *indoor* e della eventuale emissione di un certificato di prova in qualità secondo la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 è necessario che ogni campione di polvere inviato al laboratorio CONTARP sia corredato di relativa Scheda Campagna di Monitoraggio e di Modulo e Scheda di invio campioni.

ALLEGATO 4 A**PROTOCOLLO DI ANALISI PER DER P 1**

1. L'anticorpo monoclonale mAb 5H8 è fornito purificato in HPLC e conservato in PBS alla concentrazione di 2mg/ml. Rivestire i micropozzetti delle piastre in polistirene con 200ng di mAb 5H8 in ogni pozzetto (per esempio 100µl di mAb diluiti 1:1000) in 50mM di carbonato-bicarbonato, pH 9.6. Incubare per tutta la notte a 4°C.
2. Lavare i pozzetti per 3 volte con PBS-0.05% Tween 20, pH 7.4 (PBS-T). Incubare per 1 ora con 0.1ml di 1% BSA PBS-T, lavare per 3 volte con PBS-T e asciugare.
3. Aggiungere 0.1ml dei campioni diluiti. I campioni di polvere sono generalmente diluiti al raddoppio da 1:10 a 1:80. Usare diluizioni al raddoppio dello standard* per costruire la curva di controllo. Le diluizioni della curva di controllo vanno da 250ng a 0.5ng/ml dello standard Der p 1. Pipettare 20µl dello standard 2402 di Der p 1 in 180µl di 1% BSA PBS-T nei primi pozzetti delle righe A e B della piastra ELISA. Mescolare bene e trasferire 100µl lungo i pozzetti delle due righe dove sono stati già messi 100µl di 1% BSA PBS-T al fine di avere 10 diluizioni al raddoppio. I pozzetti A 12 e B 12 dovrebbero contenere solo 1% BSA PBS-T come controlli. Incubare per 1 ora
4. Lavare i pozzetti per 3 volte con PBS-T, poi incubare per 1 ora con 0.1ml di anticorpo biotinilato anti Group 1 mAb 4C1 diluito 1/1000 (equivalente a circa 10ng di anticorpo 4C1).
5. Lavare i pozzetti per 3 volte con PBS-T, poi incubare per 30 minuti con 0.1ml di Streptavidina-Perossidasi diluita 1/1000 (Sigma S5512, 0.25mg ricostituita in 1ml di acqua distillata). La streptavidina deve essere diluita in 1% BSA PBS-T. Lavare i pozzetti per tre volte e far sviluppare l'analisi aggiungendo 0.1ml di 1mM ABTS in 70mM di tampone citrato-fosfato., pH 4.2 e H₂O₂ ad una diluizione di 1/1000.
6. Leggere la piastra quando l'assorbanza (405nm) raggiunge i valori di 2.0-2.4 o bloccare la reazione aggiungendo 0.1ml di 2mM di Sodio Azide. Le letture dell'assorbanza sono direttamente proporzionali alla quantità di Der p 1 legata e i valori sono interpolati dalle rispettive curve di controllo.

*Lo standard Der p 1 contiene 2500ng/ml di Der p 1 ed è stato sotto-standardizzato a partire dal riferimento *D. pteronyssinus* WHO/UIS (NIBSC 82/518), che contiene 12.5µg/ml di Der p 1.

ALLEGATO 4 B**PROTOCOLLO DI ANALISI PER DER F 1**

1. L'anticorpo monoclonale mAb 6A8 è fornito purificato in HPLC e conservato in PBS alla concentrazione di 2mg/ml. Rivestire i micropozzetti delle piastre in polistirene con 200ng di mAb 6A8 in ogni pozzetto (per esempio 100µl di mAb diluiti 1:1000) in 50mM di carbonato-bicarbonato, pH 9.6. Incubare per tutta la notte a 4°C.
2. Lavare i pozzetti per 3 volte con PBS-0.05% Tween 20, pH 7.4 (PBS-T). Incubare per 1 ora con 0.1ml di 1% BSA PBS-T, lavare per 3 volte con PBS-T e asciugare.
3. Aggiungere 0.1ml dei campioni diluiti. I campioni di polvere sono generalmente diluiti al raddoppio da 1:10 a 1:80. Usare diluizioni al raddoppio dello standard* per costruire la curva di controllo. Le diluizioni della curva di controllo vanno da 250ng a 0.5ng/ml dello standard Der f 1. Pipettare 20µl dello standard 2402 di Der p 1 in 180µl di 1% BSA PBS-T nei primi pozzetti delle righe A e B della piastra ELISA. Mescolare bene e trasferire 100µl lungo i pozzetti delle due righe dove sono stati già messi 100µl di 1% BSA PBS-T al fine di avere 10 diluizioni al raddoppio. I pozzetti A 12 e B 12 dovrebbero contenere solo 1% BSA PBS-T come controlli. Incubare per 1 ora.
4. Lavare i pozzetti per 3 volte con PBS-T, poi incubare per 1 ora con 0.1ml di anticorpo biotinilato anti Group 1 mAb 4C1 diluito 1/1000 (equivalente a circa 10ng di anticorpo 4C1).
5. Lavare i pozzetti per 3 volte con PBS-T, poi incubare per 30 minuti con 0.1ml di Streptavidina-Perossidasi diluita 1/1000 (Sigma S5512, 0.25mg ricostituita in 1ml di acqua distillata). La streptavidina deve essere diluita in 1% BSA PBS-T. Lavare i pozzetti per tre volte e far sviluppare l'analisi aggiungendo 0.1ml di 1mM ABTS in 70mM di tampone citrato-fosfato, pH 4.2 e H₂O₂ ad una diluizione di 1/1000.
6. Leggere la piastra quando l'assorbanza (405nm)raggiunge i valori di 2.0-2.4 o bloccare la reazione aggiungendo 0.1ml di 2mM di Sodio Azide. Le letture dell'assorbanza sono direttamente proporzionali alla quantità di Der p 1 legata e i valori sono interpolati dalle rispettive curve di controllo.

*Lo standard Der f 1 2435 contiene 2500ng/ml di Der f 1 ed è stato sotto-standardizzato a partire dal riferimento *D. pteronyssinus* WHO/UIS (NIBSC 82/518), usando una cross-reazione RIA (al momento, non c'è un Riferimento Internazionale per *D. farinae*)

ALLEGATO 4 C**PROTOCOLLO DI ANALISI PER MITE GROUP 2**

1. L'anticorpo monoclonale Anti-Group 2, 1D8, è fornito purificato in HPLC e conservato in PBS alla concentrazione di 2mg/ml. Rivestire i micropozzetti delle piastre in polistirene con 200ng di mAb 1D8 in ogni pozzetto (per esempio 100µl di mAb diluiti 1:1000, 10µl in 10ml) in 50mM di carbonato-bicarbonato, pH 9.6. Incubare per tutta la notte a 4°C.
2. Lavare i pozzetti per 3 volte con PBS-0.05% Tween 20, pH 7.4 (PBS-T). Incubare per 1 ora con 0.1ml di 1% BSA PBS-T, lavare per 3 volte con PBS-T e asciugare.
3. Aggiungere 0.1ml dei campioni diluiti. I campioni di polvere sono generalmente diluiti al raddoppio da 1:10 a 1:80. Usare diluizioni al raddoppio dello standard *D. pteronyssinus* (5000ng/ml di Der p 2)* per costruire la curva di controllo. Le diluizioni della curva di controllo vanno da 250ng a 0.5ng/ml dello standard Der p 2. Incubare per 1 ora.
4. Lavare i pozzetti per 3 volte con PBS-T, poi incubare per 1 ora con 0.1ml di anticorpo biotinilato 7A1 diluito 1/1000.
5. Lavare i pozzetti per 3 volte con PBS-T, poi incubare per 30 minuti con 0.1ml di Streptavidina-Perossidasi diluita 1/1000 (Sigma, St. Louis, MO, Cat. #S5512; 1mg ricostituito in 4ml di acqua distillata; per esempio 0.25mg/ml). La streptavidina deve essere diluita in 1% BSA PBS-T. Lavare i pozzetti per tre volte e far sviluppare l'analisi aggiungendo 0.1ml di 1mM ABTS in 70mM di tampone citrato-fosfato., pH 4.2, contenente 0.03% di H₂O₂.
6. Leggere la piastra quando l'assorbanza (405nm) raggiunge i valori di 2.0-2.4 o bloccare la reazione aggiungendo 0.1ml di 2mM di Sodio Azide. Le letture dell'assorbanza sono direttamente proporzionali alla quantità di allergene legato e i valori sono interpolati dalle rispettive curve di controllo.

ALLEGATO 4 D**PROTOCOLLO DI ANALISI PER BLA G 2**

1. L'anticorpo monoclonale di cattura anti-Bla g 2, 7C11, è fornito purificato in HPLC, in una soluzione a 1mg/ml in PBS, pH 7.4. Rivestire i micropozzetti delle piastre (Immunolon II) con 10 μ l/10ml di standard 7C11 in 50mM di tampone carbonato-bicarbonato, pH 9.6. Incubare per tutta la notte a 4°C.
2. Lavare i pozzetti per 3 volte con PBS-T e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente con 0.1ml di 1% BSA PBS-T. Lavare per 3 volte con PBS-T.
3. Viene costruita una curva di controllo con lo standard di *Blattella germanica*. Lo standard contiene 2000ng/ml di Bla g 2. Diluizioni al raddoppio dello standard sono usate per costruire la curva da 200ng/ml a 0,4ng/ml. Pipettare 20 μ l dello standard Bla g 2 in 180 μ l di 1% BSA PBS-T nei pozzetti A1 e B1 della piastra ELISA. Mescolare bene e trasferire 100 μ l lungo i pozzetti delle due righe dove sono stati già messi 100 μ l di 1% BSA PBS-T al fine di avere 10 diluizioni al raddoppio. I pozzetti A11, A12 e B11, B12 dovrebbero contenere solo 1% BSA PBS-T come controlli. Incubare per 1 ora.
4. Aggiungere 100 μ l dei campioni di allergeni diluiti o degli estratti di polvere nei pozzetti (usare 1% BSA PBS-T come diluente per i reagenti) e incubare per 1 ora a temperatura ambiente. Gli estratti di polvere sono diluiti da 1:5 a 1:40 in 1% BSA PBS-T.
5. Lavare i pozzetti per 3 volte con PBS-T, e aggiungere in ciascun pozzetto 100 μ l di anticorpo di coniglio anti-rBla g 2. La soluzione dell'anticorpo contiene il 50% di glicerolo e dovrebbe essere diluita 1:1000 in 1% BSA PBS-T. Incubare per 1 ora a temperatura ambiente.
6. Lavare i pozzetti per 3 volte e aggiungere perossidasi coniugata con IgG di capra anti coniglio diluita 1:1000 (Jackson Laboratories Cat. # 111-036-045 o fornitore equivalente). Incubare per 1 ora a temperatura ambiente.
7. Lavare i pozzetti per tre volte e aggiungere 100 μ l per pozzetto di una soluzione substrato di ABTS/H₂O₂. Leggere la Densità Ottica (OD) a 405nm in un lettore di piastre ELISA quando il colore si sviluppa ad una OD di 2.0-2.4.

ALLEGATO 4 E**PROTOCOLLO DI ANALISI PER FEL D 1**

1. L'anticorpo monoclonale di cattura anti-Fel d 1, 6F9, è fornito purificato in HPLC, in una soluzione a 2mg/ml in PBS, pH 7.4. Rivestire i micropozzetti delle piastre in polistirene con 200ng di 6F9 per pozzetto, per esempio 100µl di una diluizione 1:1000 (10µl/10ml) in 50mM di tampone carbonato-bicarbonato, pH 9.6. Incubare per tutta la notte a 4°C.
2. Lavare i pozzetti per 2 volte con PBS-T e incubare per 30 minuti con 100µl di 1% BSA PBS-T. Lavare per 2 volte con PBS-T.
3. Aggiungere 100µl dei campioni di allergeni diluiti. Gli estratti di polvere sono generalmente diluiti da 1:5 a 1:625 in 1% BSA PBS-T. Usare diluizioni al raddoppio dello standard Fel d 1 per costruire la curva di controllo. Questo standard contiene 200mU/Fel d 1 e dovrebbe essere diluito 1:10 per costruire la prima diluizione sulla curva, da 20mU/ml a 0,04mU/ml. Incubare per 1 ora.
4. Lavare i pozzetti per 3 volte con PBS-T e incubare per 1 ora con 100µl di anticorpo biotinilato mAb 3E4 diluito 1/1000 con 1% BSA PBS-T.
5. Lavare i pozzetti per 3 volte con PBS-T e incubare per 30 minuti con 100µl di Streptavidina-Perossidasi diluita 1/1000 (Sigma S5512, 0.25mg ricostituita in 1ml di acqua distillata) in 1% BSA PBS-T. Lavare i pozzetti per tre volte e sviluppare la reazione aggiungendo 0.1ml di ABTS contenente 0,03% di H₂O₂.

Leggere la piastra ad un lettore per ELISA quando la O.D. a 405nm raggiunge i valori di 2.0-2.4.

Note:

Lo standard Fel d 1 è stato sotto-standardizzato dallo standard di gatto CBER, E5, che contiene 9.7U/ml di Fel d 1 (1 unità = 4µg di proteina). I valori di Fel d 1 sono interpolati dalla parte lineare della curva.

ALLEGATO 4 F**PROTOCOLLO DI ANALISI PER ASP F 1**

1. L'anticorpo monoclonale anti Asp f 1, mAb 4A6, è fornito purificato in SAS come soluzione a 10mg/ml in PBS. Rivestire i micropozzetti delle piastre in polistirene (Immunolon II, Dynatech) con 10 μ l/10ml di mAb 4A6 in ogni pozzetto (per esempio 100 μ l di mAb diluiti 1:1000) in 50mM di carbonato-bicarbonato, pH 9.6. Incubare per tutta la notte a 4°C.
2. Lavare i pozzetti per 3 volte con PBS-0.05% Tween 20, pH 7.4 (PBS-T). Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente con 0.1ml di 1% BSA PBS-T. Lavare per 3 volte con PBS-T.
3. Usare diluizioni al raddoppio dello standard Asp f 1 per costruire la curva di controllo. Le diluizioni della curva di controllo vanno da 250ng a 0.5ng/ml dello standard Der f 1. Pipettare 20 μ l dello standard Asp f 1 in 180 μ l di 1% BSA PBS-T nei pozzetti A1 e B2 della piastra ELISA. Mescolare bene e trasferire 100 μ l lungo i pozzetti delle due righe dove sono stati già messi 100 μ l di 1% BSA PBS-T al fine di avere 10 diluizioni al raddoppio. I pozzetti A11, 12 e B11, B12 dovrebbero contenere solo 1% BSA PBS-T come controlli. Incubare per 1 ora.
4. Aggiungere 0,1ml di campioni di allergeni diluiti e incubare per 1 ora a temperatura ambiente. I campioni di polvere sono diluiti da 1:10 a 1:80.
5. Lavare i pozzetti per tre volte con PBS-T e aggiungere 0,1ml di anticorpo diluito di coniglio anti-Asp f 1. La soluzione di anticorpo policlonale contiene il 50% di glicerolo e dovrebbe essere diluita 1:1000 in 1% BSA PBS-T. Incubare per 1 ora a temperatura ambiente.
6. Lavare i pozzetti per 3 volte e aggiungere perossidasi coniugata con IgG di capra anti coniglio diluita 1:1000 (Jackson Laboratories Cat. # 111-036-045 o fornitore equivalente). Incubare per 1 ora a temperatura ambiente.
7. Lavare i pozzetti per tre volte e sviluppare l'analisi aggiungendo 0.1ml di ABTS 1mM in tampone citrato-fosfato 70mM, pH 4.2, e H₂O₂ ad una diluizione di 1/1000. Leggere la piastra quando l'assorbanza a 405nm raggiunge i valori di 2.0-2.4.

ALLEGATO 4 G**PROTOCOLLO DI ANALISI PER ALT A 1**

1. L'anticorpo monoclonale anti Alt a 1 mAb 121 è fornito purificato in HPLC e conservato in PBS alla concentrazione di 0,1mg/ml.

Rivestire i micropozzetti delle piastre in polistirene (Immunolon II, Dynatech) con 100µl di mAb 121 a 100µl/10ml, ad esempio una diluizione 1 a 100 dello stock, in 50mM di carbonato-bicarbonato, pH 9.6. Incubare per tutta la notte a 4°C.

2. Lavare i pozzetti per 3 volte con PBS-0.05% di Tween 20, pH 7.4 (PBS-T). Bloccare i pozzetti aggiungendo 100µl di PBS-T contenenti BSA all'1%. Incubare per 1 ora a temperatura ambiente.

Usare diluizioni al raddoppio dello standard rAlt a 1 per costruire una curva di controllo. Le diluizioni della curva di controllo vanno da 100 a 0,2ng/ml di Alt a 1. Pipettare 20µl dello standard Alt a 1 in 180µl di 1% BSA PBS-T nei pozzetti A1 e B1 delle righe A e B della piastra ELISA. Mescolare bene e trasferire 100µl lungo i pozzetti delle due righe dove sono stati già messi 100µl di 1% BSA PBS-T al fine di avere 10 diluizioni al raddoppio. I pozzetti A12 e B12 dovrebbero contenere solo 1% BSA PBS-T come controlli.

3. Aggiungere 0,1ml dei campioni di allergeni diluiti e incubare per un'ora a temperatura ambiente. I campioni di polvere per l'analisi di Alt a 1 sono diluiti da 1:5 a 1:40.
4. Lavare i pozzetti per 3 volte con PBS-T, poi incubare per 1 ora con 0.1ml di anticorpo biotinilato anti Group 1 mAb 4C1 diluito 1/1000 (equivalente a circa 10ng di anticorpo 4C1).
5. Lavare i pozzetti per 3 volte con PBS-T e aggiungere 0,1ml di anticorpo biotinilato diluito anti Alt a 1 mAb 121. La soluzione dell'anticorpo contiene il 50% di glicerolo e dovrebbe essere diluita 1:1000 in 1% BSA PBS-T. Incubare per 1 ora a temperatura ambiente.
6. Lavare i pozzetti per tre volte e aggiungere 0,1ml di Streptavidina-Perossidasi (Sigma S5512, 0.25mg ricostituiti in 1ml di acqua distillata). La streptavidina dovrebbe essere diluita 1:1000 in 1% BSA PBS-T. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
7. Lavare i pozzetti per tre volte e sviluppare l'analisi aggiungendo 0.1ml di ABTS in tampone citrato-fosfato 70mM, pH 4.2, e H₂O₂ ad una diluizione di 1/1000. Leggere la piastra quando l'assorbanza a 405nm raggiunge i valori di 2.0-2.4.

