

## RILEVAMENTI MICROBIOLOGICI IN STABILIMENTI UTILIZZATORI DI ANIMALI PER FINI SCIENTIFICI E SPERIMENTALI: DATI PRELIMINARI

Laura Achene, Antonio Di Virgilio, Rodolfo Lorenzini

*Servizio Qualità e Sicurezza della Sperimentazione Animale - Istituto Superiore di Sanità, Roma*

### Introduzione

Il controllo di qualità dell'aria negli impianti di sperimentazione sta assumendo una sempre maggiore rilevanza sia per gli aspetti connessi alle problematiche di salute dei lavoratori che per le ovvie implicazioni negative sia dirette che indirette sulla validità dei risultati sperimentali che possono derivare dalla presenza nell'aria di inquinanti chimici, biologici e fisici.

Per il particolare tipo di attività svolta negli impianti di stabulazione dell'Istituto Superiore di Sanità si è deciso di avviare una campagna di monitoraggio dei nostri locali relativamente agli aspetti microbiologici.

### Materiali e metodi

Per il controllo dell'aria abbiamo utilizzato un'apparecchiatura commerciale, SAS (*Surface Air System*) della Pool Bioanalysis Italiana di Milano; tale strumento è costituito dal campionatore vero e proprio, dalla batteria di alimentazione del tipo ricaricabile e da un supporto da tavolo o da pavimento che consente di orientare il frontale di prelievo in qualsiasi posizione grazie anche ad un pulsante per il comando a distanza.

Il funzionamento di tale apparecchio è basato sull'aspirazione a flusso laminare, a velocità costante (180 l/min) di aria confinata. Tempo e quantità del prelievo sono prefissabili dall'operatore. Tale flusso d'aria viene convogliato attraverso una superficie perforata, su una speciale piastra di Petri (piastre *Contact Plate*), disposta nella parte anteriore dell'apparecchio, contenente il terreno nutritivo specifico per i microrganismi che si vogliono ricercare. L'apparecchio è dotato di un selettore a 15 variabili di unità mediante il quale è possibile stabilire diversi tempi di prelievo, ogni unità variabile corrisponde a 20 secondi di funzionamento del motore, cioè a 60 litri di aria aspirata.

Per quanto riguarda la scelta dei terreni si è data la preferenza per la conta totale dei batteri mesofili aerobi allo *Standard Plate Count Agar* (ditta Oxoid), un terreno altamente nutritivo studiato per avere dei risultati standard con conteggi statisticamente validi, al *Baird-Parker Agar* (ditta Oxoid) per la ricerca degli stafilococchi, allo *Slanetz and Bartley Medium* (ditta Oxoid) per evidenziare ed enumerare gli streptococchi fecali.

al *Violet Red Bile Agar* (ditta Oxoid) per la ricerca delle Enterobatteriacee ed altri generi quali *Aeromonas* e *Yersinia* ed infine ai *Malt Extract Agar* e *Rose Bengal Chloramphenicol Agar* (ditta Oxoid) per il rilevamento, l'isolamento e il conteggio selettivo di lieviti e muffe.

Dopo la permanenza delle piastre ai tempi ed alle temperature adeguati, si procedeva al conteggio delle colonie: da tale conteggio, applicando una semplice formula matematica, si risale al numero di microrganismi/m<sup>3</sup> di aria confinata. Le colonie sviluppatesi sui vari terreni selettivi sono state identificate eseguendo in primo luogo l'esame microscopico di strisci colorati con la tecnica della colorazione di Gram per quanto riguarda i batteri e di blu cotone di lattofenolo per i miceti; successivamente sugli isolati venivano condotti tests biochimici miniaturizzati API della ditta Bio-Merieux.

L'esperienza si è svolta in dieci locali di stabulazione del settore topi e ratti e in sei locali del settore cavie e conigli.

Nel settore topi e ratti tutti i locali sono forniti di due porte opposte che si affacciano l'una su un corridoio centrale (pulito), l'altra sul rispettivo corridoio laterale (sporco). L'impianto di condizionamento fornisce un numero variabile di ricambi/ora comunque in misura non inferiore a 9 ricambi totali d'aria/ora ed assicura, in condizioni ottimali di funzionamento, i seguenti parametri termoigrometrici per un periodo di 24 ore su 24: temperatura regolabile tra 22-25 C° con umidità relativa tarata su 48-60%.

Per quanto riguarda il settore cavie e conigli, al momento del prelievo in ristrutturazione la tipologia era completamente diversa: le stanze si affacciano su un unico corridoio centrale e manca così la divisione tra un passaggio "per lo sporco" ed uno "per il pulito". All'interno di tali stanze l'impianto di condizionamento non assicurava al momento dei nostri prelievi un completo filtraggio dell'aria.

Il nostro piano di lavoro, per il settore topi e ratti, è consistito nel prelevare in doppio per sei cicli continuativi nell'arco di cinque giorni, prima dell'inizio delle normali attività lavorative, campioni di aria confinata al centro delle stanze (ad una altezza di circa 170 cm dal suolo) ed in corrispondenza delle griglie di mandata dell'aria condizionata.

Per quanto riguarda invece il settore cavie e conigli il piano di lavoro è consistito nel prelevare in doppio, nell'arco di cinque giorni prima dell'inizio delle normali attività lavorative, campioni di aria confinata solo al centro delle stanze in quanto le bocchette di uscita dell'aria sono site al centro della stanza.

Prima di esaminare i risultati da noi ottenuti è importante fare una distinzione tra "ambienti critici ed ambienti normali".

### **Ambienti critici**

In questi locali l'aria è filtrata, la pressione è positiva e viene mantenuta mediante filtrazione sterile dell'aria; tutto ciò che deve essere introdotto è sterilizzato e decontaminato attraverso un sistema barriera.

Il Personale opera dall'esterno mediante guanti o comandi a distanza.

Scendendo la scala di criticità si trova l'ambiente nel quale il personale opera internamente dopo aver provveduto al cambio completo di abiti. In questo ambiente la pressione è positiva, l'aria è filtrata ma alcuni microrganismi sono presenti.

### Ambienti normali

In queste aree non si ha la filtrazione dell'aria o la pressione positiva.

Comunque al vertice di questa seconda classificazione si trovano gli ambienti dove l'accesso al personale è limitato e dove è obbligatorio il cambio di abiti. Finestre e porte sono chiuse e l'impianto di circolazione di aria è a circuito chiuso con un certo grado di filtrazione. Scendendo questa scala si giunge fino agli ambienti dove c'è molto movimento di personale ma dove il controllo dell'igiene è ancora fondamentale.

In rapporto a questa distinzione possiamo classificare i locali di stabulazione da noi osservati quali ambienti normali.

Alcuni Autori hanno fissato dei limiti di accettabilità per il grado di contaminazione microbica ambientale, sia per gli ambienti critici che per quelli normali frutto di una serie di campionamenti effettuati (Tab. 1).

**Tabella 1.** - *Limiti di accettabilità in unità formanti colonie /m<sup>3</sup> per ambienti critici (a sinistra) e normali a (destra).*

Classificazione	Lim. Acc. ufc/m <sup>3</sup>	Classificazione	Lim. Acc. ufc/m <sup>3</sup>
Sterile	0	1° Grado	100-250
Classe I	5	2° Grado	251-500
Classe II	15	3° Grado	501-750
Classe III	75	4° Grado	751-1000
Classe IV	100	5° Grado	1001-1500
		6° Grado	1501-2000
		7° Grado	oltre 2000

### Risultati e discussione

I microrganismi presenti nell'aria confinata di uno stabulario provengono ammesso il buon funzionamento del sistema di filtrazione dell'aria, dagli animali, dal personale e dai materiali che vengono introdotti nelle stanze. La stessa diffusione dei microrganismi nell'aria confinata non è uniforme essendo influenzata da vari fattori: ambientali (temperatura ed umidità), legati alla tipologia dell'impianto (numero e disposizione di porte, finestre e griglie di condizionamento, tipo di pavimento, pareti, soffitto e banchi di lavoro), dal numero e dal movimento delle persone all'interno degli stessi. Le ampie

fluttuazioni dei valori della carica microbica da noi registrate sia all'interno delle varie stanze che fra di esse sono in linea con quanto sopra.

Per quanto riguarda i risultati da noi ottenuti nel settore cavie/conigli i valori della carica microbica espressi in ufc (unità formanti colonie) /m<sup>3</sup> di aria confinata sono riportati in Tabella 2.

**Tabella 2.** - Carica microbica in corrispondenza del centro della stanza ( $\bar{x}$ =media,  $s$ =deviazione standard, CV=coefficiente di variabilità)

Giorni	STANZE					
	1	4	10	11	13	14
1	2118	1923	2772	2833	2822	2616
2	2467	2883	2572	2056	1800	2058
3	1800	2716	3077	2572	1923	2324
4	2056	2822	3011	1923	2118	2634
5	1578	1800	2324	2616	2467	1923
$\bar{x}$	2003	2428.8	2571.2	2410	2221	2311
$s$	336.6	523.1	311.7	404.6	417.8	320.96
CV	0.17	0.21	0.11	0.17	0.19	0.14

Dall'analisi dei conteggi medi da noi ottenuti si osserva, riferendoci alla Tabella 1 che le stanze del settore cavie/conigli rientrano nel 7° grado della classificazione degli ambienti normali essendo i valori medi della carica batterica di ogni stanza superiori alle 2 000 ufc/m<sup>3</sup>.

Tali risultati, che portano a giudicare la qualità dell'aria di tale settore piuttosto scadente sono imputabili, come precedentemente sottolineato, ad un imperfetto funzionamento del sistema di filtraggio e di condizionamento dell'aria con ovvie conseguenze quali aumento della temperatura, del tasso di umidità relativa e della carica batterica.

Tali indagini preliminari hanno portato alla completa ristrutturazione del settore, che è ancora in corso.

Passando invece all'analisi dei dati ottenuti nel settore topi/ratti la situazione si presenta completamente diversa;

Nelle Tabelle 3 e 4 sono riportati i valori delle cariche microbiche rilevate rispettivamente in corrispondenza delle griglie dell'aria condizionata e in corrispondenza del centro delle celle. Come si evince dall'analisi della Tabella 3 l'aria in uscita dalle griglie di condizionamento si può definire di ottima qualità, in quanto contiene un numero di microrganismi molto basso, oscillante tra la I° e la II° classe degli ambienti critici.

**Tabella 3.** - Carica microbica in corrispondenza delle griglie dell'aria condizionata ( $\bar{x}$ =media,  $s$ =deviazione standard, CV=coefficiente di variabilità)

Giorni	STANZE									
	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	3	8	12	5	1	6	18	8	11	12
2	9	20	9	10	2	9	13	12	6	9
3	12	10	14	6	4	8	9	9	8	12
4	6	5	10	12	5	5	6	6	3	18
5	2	17	3	9	8	3	6	5	3	7
6	3	12	10	2	10	8	11	3	6	14
7	4	0	6	0	6	7	9	6	9	14
8	8	6	4	5	7	12	8	12	4	9
9	0	7	13	3	3	17	12	8	7	6
10	1	1	0	3	0	13	5	4	12	4
11	8	9	20	4	12	10	6	9	16	13
12	8	5	4	1	9	12	3	9	9	17
13	12	5	13	1	6	9	8	6	5	14
14	5	10	14	6	4	12	4	15	11	12
15	4	7	14	2	4	14	4	8	4	3
16	9	3	12	0	6	6	12	4	16	11
17	3	3	9	2	11	3	6	6	7	9
18	6	9	7	1	9	11	6	3	5	12
19	7	11	10	1	7	5	5	3	13	16
20	2	7	7	6	8	6	3	1	9	9
21	18	12	6	9	4	3	2	6	6	6
22	15	9	5	3	6	3	9	5	5	5
23	3	10	5	1	3	9	7	12	11	9
24	8	7	2	3	2	7	1	9	7	12
25	8	12	6	2	5	3	2	3	12	8
26	0	3	3	10	11	12	14	8	6	4
27	9	9	3	3	9	9	9	6	4	11
28	5	4	10	6	8	6	6	5	8	6
29	11	10	5	5	4	5	9	8	9	8
30	9	20	4	2	2	5	2	6	4	3
$\bar{x}$	8.60	8.37	8.00	4.10	5.87	7.93	7.17	6.83	7.87	9.77
$s$	4.33	4.85	4.61	3.25	3.17	3.72	4.02	3.20	3.60	4.12
CV	0.65	0.58	0.58	0.79	0.54	0.47	0.58	0.47	0.45	0.42

**Tabella 4.** - *Carica microbica in corrispondenza del centro della stanza (x=media, s=deviazione standard, CV=coefficiente di variabilità).*

Giorni	STANZE									
	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	100	41	851	3433	266	191	250	66	66	1850
2	133	25	595	416	8	25	8	41	8	1483
3	75	66	611	491	75	33	8	91	25	125
4	100	50	712	150	75	25	25	8	41	266
5	83	33	278	2175	50	58	16	8	41	1458
6	116	25	905	3858	325	158	241	108	900	766
7	150	50	340	316	25	41	25	50	416	250
8	100	58	463	258	58	33	25	33	275	158
9	100	8	471	100	8	33	41	8	41	2075
10	75	8	217	591	8	25	75	41	341	841
11	83	50	1088	791	191	241	308	241	2008	608
12	108	1	687	350	83	50	125	50	416	491
13	91	8	595	691	50	33	50	83	691	208
14	75	33	770	975	91	25	25	41	8	491
15	125	8	807	2791	41	8	25	58	483	891
16	100	75	471	583	241	191	158	75	625	266
17	83	41	418	400	66	8	50	25	208	375
18	116	41	463	525	66	8	75	16	133	416
19	100	25	387	883	91	16	8	16	133	533
20	75	50	463	591	25	50	8	8	6	463
21	175	32	471	463	70	178	189	34	117	275
22	71	55	335	317	51	45	26	12	88	206
23	117	34	399	209	38	34	10	6	102	326
24	96	19	463	178	69	38	19	6	112	297
25	78	6	499	117	66	39	5	19	50	178
26	78	17	770	99	73	117	73	73	116	130
27	119	8	646	73	34	71	15	40	70	175
28	92	11	739	88	55	51	9	18	70	141
29	101	22	646	101	69	29	9	10	88	141
30	86	10	627	106	71	8	31	3	11	83
x	100.03	30.3	572.9	737.3	81.3	62.07	64.4	42.93	256.3	532.2
s	23.92	20.18	199.97	989.13	75.41	63.74	82.37	47.19	401.62	526.35
CV	0.24	0.66	0.35	1.34	0.93	1.03	1.28	1.10	1.57	0.98

Per quanto riguarda invece l'analisi della carica microbica al centro delle stanze, riferendoci sempre alla Tabella 1, si può notare che 4 stanze si collocano positivamente

tra le classi II° e III° degli ambienti critici, 2 stanze tra le classi III° e IV° degli ambienti critici, 1 stanza ricade nel 2° grado degli ambienti normali e le rimanenti nel 3° grado degli ambienti normali.

Si è voluto a questo punto mettere in relazione le variazioni della carica microbica con diversi fattori che teoricamente possono influire su di essa quali umidità, temperatura e numero degli animali per stanza espresso come peso vivo totale medio per stanza.

Con l'ausilio della statistica calcolando il coefficiente di correlazione lineare tra le variabili sopra menzionate, prese due a due e con il calcolo della regressione semplice lineare ponendo in relazione le variazioni della carica batterica rispettivamente con le variazioni dell'umidità, della temperatura e del peso corporeo degli animali è risultato che soltanto la variabile umidità influisce in modo statisticamente significativo sulla carica batterica. Tuttavia è opportuno sottolineare che le variazioni dell'umidità rientrano sempre nell'ambito degli standards previsti dall'ILAR.

Dal punto di vista qualitativo i microrganismi più comuni, isolati con i nostri metodi, nell'aria confinata del nostro stabulario sono riportati in Tabella 5.

Dall'osservazione della tabella è possibile notare che la maggior parte delle specie microbiche isolate, non rappresenta un reale rischio per la salute dei lavoratori (la suddivisione in microrganismi, patogeni e non è stata fatta riferendosi al DLgs 626/94 sulla protezione della Salute dei Lavoratori).

Per quanto riguarda le specie patogene è importante sottolineare che sono state isolate in un ristretto numero di casi.

## **Conclusioni**

Sebbene le problematiche riguardanti la contaminazione biologica dell'aria siano ampiamente affrontate da tempo, non si è ancora in possesso di informazioni definitive, soprattutto per ciò che concerne la significatività dei risultati. Infatti i dati sull'argomento sono ancora limitati e in alcuni casi frammentari e contraddittori. Poche soprattutto sono le informazioni sui rischi sulla salute derivanti dall'esposizione continuata ai biocontaminanti aerei da parte degli individui nonché sugli effetti a breve e a lungo termine.

Da questo punto di vista sarebbe pertanto prioritario standardizzare le procedure di campionamento e di analisi; questo è possibile in base all'analisi dei dati ottenuti, e giungere alla definizione delle concentrazioni "normali di riferimento" dei più importanti e comuni biocontaminanti dell'aria indoor nei diversi ambienti (ospedali, laboratori, stabulari, industrie, uffici, scuole, abitazioni). In seguito, in considerazione delle concentrazioni di fondo della flora batterica e fungina aerodispersa nei vari ambienti, i risultati ottenuti potranno essere utilizzati per costituire la base di riferimento per effettuare valutazioni di rischio per la salute delle persone esposte.

Tabella 5. - *Microrganismi isolati negli impianti di stabulazione.*

Microrganismi	Patogeni	Non patogeni
<i>Bacillus sp.</i>		X
<i>Enterobacter agglomerans</i>		X
<i>Enterobacter cloacae</i>	X	
<i>Enterococcus faecalis</i>		X
<i>Enterococcus faecium</i>		X
<i>Escherichia coli 1 e 2</i>		X
<i>Klebsiella oxytoca</i>	X	
<i>Staphylococcus aureus</i>	X	
<i>Staphylococcus capitis</i>		X
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		X
<i>Staphylococcus xylosus</i>		X
<i>Streptococcus uberis</i>		X
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>		X
<i>Serratia liquefaciens</i>		X
<i>Serratia odorifera</i>		X
<i>Alternaria</i>		X
<i>Aspergillus flavus</i>		X
<i>Aspergillus niger</i>	X	
<i>Criptococcus albidus</i>		X
<i>Epicoccum</i>		X
<i>Heterosporium</i>		X
<i>Mucor</i>		X
<i>Penicillium</i>		X
<i>Paecilomyces</i>		X
<i>Rhizopus</i>		X
<i>Rhodotorula rubra</i>		X

Da quanto detto emerge pertanto l'importanza di studi collaborativi sul campionamento e sui metodi analitici al fine di fornire informazioni per future standardizzazioni.

In particolare la situazione del nostro stabulario si può ritenere abbastanza soddisfacente dal momento che il 50% degli ambienti pur rientrando come tipologia fra gli ambienti normali, si colloca invece per il basso grado di inquinamento rilevato, tra gli ambienti critici; per gli altri ambienti che non entrano in tali categorie è possibile ottenere sensibili miglioramenti con semplici accorgimenti quali: il controllo dell'accesso del personale con l'obbligo del cambio di abiti (uso delle sovrascarpe, del cappellino e della mascherina), l'esecuzione di cicli di sanificazione ambientale, destinazione di ogni stanza per una singola specie di animali, ritmo di pulizia (sostituzione delle gabbie sporche con quelle pulite, con la maggior frequenza possibile).

Per quanto riguarda, invece l'utilizzo del campionatore SAS, pur riconoscendo la sua validità mediante la standardizzazione delle modalità del prelievo di aria, va sottolineata l'importanza di uno studio comparativo mediante l'utilizzo di altre campionatori.

## Bibliografia

1. COMMITTEE ON RODENTS. Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences. National Research Council: Laboratory animal management-rodents. *ILAR news*, 1977, 20 (3): L3-L15.
2. EUROPEAN COLLABORATIVE ACTION (ECA). *Indoor Air Quality and its impact on man*. Brussels: Commission of the European Communities, 1993 (Report n°12).
3. KONEMAN, E.W. *Testo-Atlante di Microbiologia Diagnostica*. Roma: Antonio Delfino Editore, 1987.
4. LACH, V. Performance of the surface air system samplers. *Journal of Hospital Infection* 1985, 6: 102-107.
5. MCFADDIN, J.F. *Media for isolation-cultivation identification-maintenance of medical bacteria*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1985, Vol. 1.
6. OTT, P., WAYNE, R. *Environments statistics and data analysis*. Florida: Lewis Boca Raton, 1995.
7. TEELMAN, K., WEIHE, W.H. Microorganism counts and distribution patterns in air conditioned animal laboratories. *Lab. Animal (London)* 1974, 8: 109-118.
8. WHITTARD, L. Controllo microbiologico dell'aria e carica batterica totale. *Notiziario tecnico della Pool Bioanalysis Italiana* 1981, 77: 1227.
9. WIERUP, M. Bacteriological examination of a modern animal house containing small laboratory animals. *Lab. Animal (London)* 1979, 13: 21-27.
10. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Indoor air quality: biological contaminants*. WHO Regional Publications, 1990 (European Series n°31).