

UN'INDAGINE SULLA CONTAMINAZIONE *INDOOR* DA MUFFE IN UNA SCUOLA PRIMARIA DI UN COMUNE DEL CENTRO ITALIA

L. BONADONNA, R. BRIANCESCO, G. LA ROSA, M. SEMPRONI

Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia

Keywords: aria *indoor*; contaminazione; esposizione; funghi; scuola.

Abstract. *Schools may be important sources of indoor contaminants exposures: a mixture of air pollutants including molds, bacteria, virus, allergens, particles and several chemical compounds can contaminate classrooms and school environments. As children are still physically developing and breathe more than adults during quiet breathing, they are more vulnerable to the consequences of indoor pollutants. Moreover, it is very difficult to maintain an acceptable indoor air quality because children spend much time in the classrooms that are generally densely populated. In particular, molds exposure in children is associated with higher risk for allergic diseases, asthmatic symptoms and respiratory infections. Although there is evidence that schools are prime candidates for fungal colonization, few studies have systematically examined the fungal flora of school buildings and related effects on children health. Following the occurrence of several disabling health conditions (weeping, conjunctivitis, skin reddening, wheeze, cough, rhinitis) among children attending a primary school located in a small city of Central Italy, an investigation was performed for investigating the real healthiness of school classrooms. Therefore, controls focused on quantification and characterization of molds in air samples of classrooms. Microclimatic characteristics were also evaluated. Air samples were collected by Surface Air System (SAS); fungi were detected by cultural methods and identified by microscopic examination and molecular techniques (PCR and sequencing). Despite the presence of moisture spots in the areas surrounding windows and radiators, relative humidity was below 41% in all the classrooms and indoor temperature ranged from 15 to 20°C (analyses were performed in the coldest season). Molds densities ranged from 10 to 2.4x10² cfu/m³ and values were compatible with those reported in literature in the same humidity and temperature conditions. Penicillium and Cladosporium were the most representative isolated genera. Both fungal genera are common molds of external environment but their spores enter the rooms with air or are carried indoor by humans and animals. The high concentration of spores in indoor places is normally associated to states of increased humidity, poor ventilation or air conditioning systems. Exposure to these genera of molds can cause allergic reactions in 2-6% of the general population in developed countries while infections related to them mainly concern immunocompromised patients. Although it is not clear what levels of fungi cause health effects, it is assumed hypothetically at 1000 cfu/m³. Nevertheless, the exposure to spores inside school, even at densities*

not exceeding this hypothetical limit, could be an important factor of sensitization in particular if it is considered the vulnerable status of children.

1. Introduzione

La lunga permanenza quotidiana nell'ambiente scolastico e la maggiore vulnerabilità dei bambini ai fattori ambientali impongono un'attenzione particolare ai requisiti di igiene e di salubrità dell'aria *indoor* nelle scuole. Condizioni microclimatiche non ottimali e una cattiva qualità dell'aria possono avere conseguenze negative sul rendimento scolastico e sulla salute degli studenti, compromettendo anche la loro continuità didattica. D'altra parte, il mantenimento di un buon livello di qualità dell'aria all'interno delle aule è reso difficile dalla protratta permanenza degli alunni nel corso della giornata, dall'elevato grado di affollamento, e dalle dimensioni solitamente ridotte di questi locali.

L'esposizione dei bambini al bioaerosol degli ambienti confinati è associata ad un aumentato rischio di contrarre malattie allergiche, asma e infezioni respiratorie (Sharpe et al., 2015; Douwes et al., 2003.). Relativamente alle patologie di natura allergica, dal Congresso Internazionale sulle allergie pediatriche (Milano, febbraio 2012) è emerso che, negli ultimi venti anni, in Italia la percentuale dei bambini allergici è aumentata dal 7 al 25%. Già il Piano nazionale della Prevenzione 2010/2012 aveva tra i suoi obiettivi la riduzione dei rischi di esposizione ad agenti chimici e biologici come gli allergeni e prevedeva la definizione di linee strategiche per migliorare gli aspetti igienico sanitari negli ambienti di vita *indoor* con particolare attenzione a scuole e altri ambienti frequentati dai bambini (Conferenza Stato Regioni, 2010). Ciò si è anche tradotto nell'elaborazione di apposite Linee di guida per la prevenzione dei fattori di rischio *indoor* per allergie e asma nelle scuole (Ministero della salute, 2010).

Nel caso particolare delle muffe, l'esposizione negli ambienti confinati a questi agenti biologici è associata significativamente a disturbi dell'apparato respiratorio, asma, aumentata sensibilità alle sostanze chimiche e alle allergie. La sintomatologia che può far seguito all'esposizione alle muffe è molto ampia: raffreddore, congestione, irritazione degli occhi, respiro corto, congiuntivite, oltre ad asma e allergie (WHO, 2009). Alcune muffe inoltre producono micotossine che hanno effetti cancerogeni, teratogeni e proprietà neurotossiche (WHO, 2009; Didwania et al., 2013.)

Sulla base di alcuni studi epidemiologici è stato stimato che nei bambini in età scolare l'esposizione a questo tipo di inquinanti nell'ambiente *indoor* può aumentare fino a cinque volte il rischio di contrarre l'asma (Immonen et al., 2000).

L'asma, d'altra parte, risulta la principale causa di assenze scolastiche nelle scuole elementari e superiori (Bayer et al., 2001). Uno studio ha anche evidenziato una percentuale di positività pari al 14% tra i bambini in età scolare sottoposti a prove allergiche per gli allergeni fungini (Taskinen et al., 2000).

Anche se le evidenze dimostrano che le scuole sono spesso oggetto di colonizzazione fungina, per condizioni microclimatiche non idonee o per vetustà degli arredi, pochi studi hanno esaminato sistematicamente la flora fungina presente nelle scuole e valutato la correlazione con lo stato di salute degli alunni.

A seguito delle molteplici segnalazioni di disturbi riconducibili a lacrimazione, congiuntivite, arrossamento cutaneo, starnuti, tosse e rinite tra i bambini che frequentavano una scuola primaria ubicata in un comune del Centro Italia, è stata effettuata un'indagine microbiologica per monitorare lo stato di salubrità delle aule, sia

mediante la quantificazione e la caratterizzazione delle muffe presenti nell'aria delle aule, sia attraverso la valutazione delle caratteristiche microclimatiche ivi presenti.

La lunga permanenza quotidiana nell'ambiente scolastico e la maggiore vulnerabilità dei bambini ai fattori ambientali impongono un'attenzione particolare ai requisiti di igiene e di salubrità dell'aria *indoor* nelle scuole. Condizioni microclimatiche non ottimali e una cattiva qualità dell'aria possono avere conseguenze negative sul rendimento scolastico e sulla salute degli studenti, compromettendo anche la loro continuità didattica. D'altra parte, il mantenimento di un buon livello di qualità dell'aria all'interno delle aule è reso difficile dalla protratta permanenza degli alunni nel corso della giornata, dall'elevato grado di affollamento, e dalle dimensioni solitamente ridotte di questi locali.

L'esposizione dei bambini al bioaerosol degli ambienti confinati è associata ad un aumentato rischio di contrarre malattie allergiche, asma e infezioni respiratorie (Sharpe et al., 2015; Douwes et al., 2003.). Relativamente alle patologie di natura allergica, dal Congresso Internazionale sulle allergie pediatriche (Milano, febbraio 2012) è emerso che, negli ultimi venti anni, in Italia la percentuale dei bambini allergici è aumentata dal 7 al 25%. Già il Piano nazionale della Prevenzione 2010/2012 aveva tra i suoi obiettivi la riduzione dei rischi di esposizione ad agenti chimici e biologici come gli allergeni e prevedeva la definizione di linee strategiche per migliorare gli aspetti igienico sanitari negli ambienti di vita *indoor* con particolare attenzione a scuole e altri ambienti frequentati dai bambini (Conferenza Stato Regioni, 2010). Ciò si è anche tradotto nell'elaborazione di apposite Linee di guida per la prevenzione dei fattori di rischio *indoor* per allergie e asma nelle scuole (Ministero della salute, 2010).

Nel caso particolare delle muffe, l'esposizione negli ambienti confinati a questi agenti biologici è associata significativamente a disturbi dell'apparato respiratorio, asma, aumentata sensibilità alle sostanze chimiche e alle allergie. La sintomatologia che può far seguito all'esposizione alle muffe è molto ampia: raffreddore, congestione, irritazione degli occhi, respiro corto, congiuntivite, oltre ad asma e allergie (WHO, 2009). Alcune muffe inoltre producono micotossine che hanno effetti cancerogeni, teratogeni e proprietà neurotossiche (WHO, 2009; Didwania et al., 2013.)

Sulla base di alcuni studi epidemiologici è stato stimato che nei bambini in età scolare l'esposizione a questo tipo di inquinanti nell'ambiente *indoor* può aumentare fino a cinque volte il rischio di contrarre l'asma (Immonen et al., 2000).

L'asma, d'altra parte, risulta la principale causa di assenze scolastiche nelle scuole elementari e superiori (Bayer et al., 2001). Uno studio ha anche evidenziato una percentuale di positività pari al 14% tra i bambini in età scolare sottoposti a prove allergiche per gli allergeni fungini (Taskinen et al., 2000).

Anche se le evidenze dimostrano che le scuole sono spesso oggetto di colonizzazione fungina, per condizioni microclimatiche non idonee o per vetustà degli arredi, pochi studi hanno esaminato sistematicamente la flora fungina presente nelle scuole e valutato la correlazione con lo stato di salute degli alunni.

A seguito delle molteplici segnalazioni di disturbi riconducibili a lacrimazione, congiuntivite, arrossamento cutaneo, starnuti, tosse e rinite tra i bambini che frequentavano una scuola primaria ubicata in un comune del Centro Italia, è stata effettuata un'indagine microbiologica per monitorare lo stato di salubrità delle aule, sia mediante la quantificazione e la caratterizzazione delle muffe presenti nell'aria delle aule, sia attraverso la valutazione delle caratteristiche microclimatiche ivi presenti.

2. Materiali e metodi

Per isolare e caratterizzare la componente fungina presente nel bioaerosol di un plesso scolastico ubicato in un comune del Centro Italia, sono stati effettuati campionamenti di aria in cinque diverse aule e, in prossimità di una finestra, è stato anche prelevato un campione di aria esterna. Per il campionamento sono state seguite le procedure indicate nei Rapporti ISTISAN 13/37 (Bonadonna et al., 2013).

Volumi noti di aria (10-100-200 L) sono stati raccolti attraverso il campionatore attivo ad impatto ortogonale aspirante monostadio Surface Air System SAS 360 e convogliati direttamente su piastre di Sabouraud Dextrose Agar (Liofilchem, Teramo) contenenti cloramfenicolo. Le piastre sono state incubate a 25°C per 5-7 giorni e le colonie con micelio sono state enumerate ed isolate. L'identificazione delle colonie fungine a livello di genere è stata effettuata mediante esame microscopico e sulla base delle caratteristiche morfologiche delle colonie. Mediante tecniche molecolari di amplificazione (PCR) e sequenziamento, per alcuni isolati, è stata confermata l'appartenenza al genere ed è stata identificata la specie. Le colonie fungine sono state frantumate meccanicamente mediante agitazione con beads di vetro e ripetuti cicli di congelamento scongelamento; il DNA è stato estratto utilizzando il kit NZY Tissue gDNA Isolation Kit (Nzytech, Lisboa). E' stata amplificata la regione ITS utilizzando la coppia di primers universali ITS1- ITS4 (White et al., 1990); i prodotti di PCR sono stati separati su gel di agarosio all'1,5%, purificati e sequenziati in entrambe le direzioni (Bio-Fab Research, Roma). Mediante il programma Blast, le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle dei prototipi presenti nella banca dati di acidi nucleici Gene Bank.

Nelle aule in cui sono stati effettuati i campionamenti dell'aria, sono stati rilevati anche i valori di temperatura e umidità relativa mediante termometro ambientale digitale (TFA, Germany).

E' stata anche effettuata un'ispezione visiva delle mura e degli arredi delle aule per cogliere eventuali segnali di umidità e di presenza di muffe.

3. Risultati

I risultati riguardanti la caratterizzazione quantitativa e qualitativa della componente fungina degli ambienti considerati sono riportati in tabella 1. La concentrazione fungina variava da 10 a 240 UFC/m³ nelle aule esaminate, mentre un valore pari a 300 UFC/m³ è stato rilevato nell'aria prelevata in corrispondenza dell'esterno dell'edificio. Sono stati evidenziati complessivamente quattro generi fungini e almeno sette distinte specie di muffe. Tra gli isolati prelevati nell'ambiente *indoor*, il 58% apparteneva al genere *Penicillium*, il 21% a *Cladosporium* e il 21% ad *Aspergillus*. Per quanto riguarda l'aria esterna, il 60% degli isolati apparteneva al genere *Cladosporium* e il 40% ad *Alternaria*.

In figura 1 è riportato il gel elettroforetico degli amplificati ottenuti dai campioni sottoposti ad amplificazione della regione ITS, poi successivamente sequenziati.

Un esame ispettivo delle aule ha evidenziato la presenza di macchie di umidità su superfici murarie intorno a finestre e radiatori. I dati relativi al rilevamento della temperatura e dell'umidità relativa sono riportati in tabella 2: le temperature variavano da 15 a 20°C e l'umidità relativa dal 36 al 41%.

Tabella 1. Concentrazione di muffe negli ambienti studiati e specie fungine identificate

Aula	Muffe (UFC/m ³)	Identificazione	
		Morfo -/ microscopica	Molecolare
1A	240	<i>Cladosporium</i> sp <i>Penicillium</i> sp	<i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Penicillium expansum</i>
2A	30	<i>Aspergillus</i> sp <i>Cladosporium</i> sp <i>Penicillium</i> sp	<i>Aspergillus versicolor</i> <i>Aspergillus</i> Section Usti
4A	10	<i>Penicillium</i> sp	<i>Penicillium expansum</i>
1B	25	<i>Cladosporium</i> sp <i>Penicillium</i> sp	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
4B	111	<i>Aspergillus</i> sp <i>Cladosporium</i> sp <i>Penicillium</i> sp	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus pseudoglaucus</i>
Esterno	300	<i>Alternaria</i> sp <i>Cladosporium</i> sp	<i>Alternaria gaisen</i> <i>Alternaria tenuissima</i>

Tabella 2. Caratteristiche fisiche degli ambienti studiati

Aula	Temperatura (°C)	Umidità relativa (%)
1A	16	37
2A	16,2	38
4A	16,4	36
1B	17,7	41
4B	20	36
Esterno	15,9	38

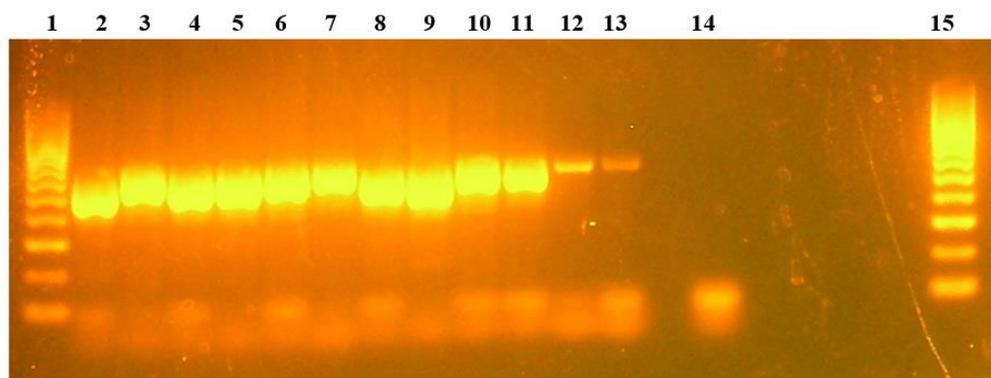


Figura 1. Migrazione elettroforetica in gel di agarosio di:

1;15: Marker 100-1000 pb; 2-12: amplificati della regione ITS degli isolati: 2) *Cladosporium cladosporioides*; 3) *Penicillium expansum*; 4) *Aspergillus versicolor*; 5) *Aspergillus* Usti section; 6) *Penicillium expansum*; 7) *Aspergillus ochraceus*; 8) *Aspergillus pseudoglaucus*; 9) *Cladosporium cladosporioides* 10) *Penicillium expansum*; 11) *Alternaria gaisen*; 12) *Alternaria tenuissima*; 13) Controllo positivo (*Alternaria alternata*); 14) Controllo negativo.

4. Discussione e conclusioni

Le muffe sono ubiquitarie e la loro presenza anche in basse concentrazioni in ambienti *indoor* salubri è una costante. Inoltre, pur normalmente presenti, la loro concentrazione all'esterno può variare in funzione delle condizioni climatiche e della stagione. Tuttavia, bisogna anche considerare che l'attività metabolica fungina determina l'emissione di molti composti volatili in grado di causare irritazione agli occhi e alle prime vie respiratorie (Papuas et al., 2000). In talune situazioni, anche affezioni più lievi, quali malessere, mal di testa, nausea e altri sintomi di natura psicosomatica, oltre alle ben più note infezioni ed allergie, possono essere ricondotte alla presenza di funghi nell'aria *indoor* (Żukiewicz-Sobczak et al., 2012). Relativamente alle patologie allergiche, nei Paesi industrializzati, è stato stimato che dal 2 al 6% della popolazione è allergica a questi bioinquinanti (Żukiewicz-Sobczak, 2013).

Le specie fungine appartenenti ai generi *Penicillium*, *Cladosporium* e *Aspergillus*, ampiamente rilevate nei locali scolastici oggetto dell'indagine, sono ubiquitarie in ambienti *outdoor* e *indoor*. Le spore o i frammenti dei loro miceli, possono essere veicolate all'uomo tramite l'aria e causare infezioni respiratorie o allergiche (Kanaani et al., 2008). *Aspergillus* può essere responsabile di patologie a carico di soggetti immunodebitati, come anche di infezioni secondarie. La sua patogenicità è riconducibile all'inalazione delle spore o delle tossine prodotte da determinate specie (Walsh et al., 2008).

Tra le specie identificate in questa indagine, *Aspergillus ochraceus*, oltre a causare asma nei bambini e malattie polmonari negli adulti a seguito di inalazione di spore, produce anche Ocratossina A, una micotossina che può contaminare gli alimenti e che, se ingerita, può causare effetti neurotossici, immunosoppressivi, genotossici, carcinogenici and teratogenici (Ravelo Abreu et al., 2015). Per quanto le micotossine abbiano generalmente una bassa volatilità e la loro inalazione a livelli significativi non sia molto probabile, non possono essere esclusi fenomeni patologici indotti in caso di massiva inalazione di spore/conidi e successiva colonizzazione dei tessuti da parte dei funghi (Flaherty et al., 1984).

Ad oggi non sono stati sviluppati studi epidemiologici e tossicologici che, sulla base di un approccio dose-risposta, abbiano consentito la stima degli effetti sulla salute umana dei vari componenti del bioaerosol e la definizione, per ogni componente, di massimi valori di concentrazione ammissibili (Gosh et al., 2015; Swan et al., 2003). Da diversi enti internazionali sono stati tuttavia pubblicati valori accettabili di concentrazione per muffe e batteri presenti nel bioaerosol. I valori consigliati sono caratterizzati da una discreta variabilità da un Paese all'altro. Relativamente alle concentrazioni fungine, in Brasile, Germania, Portogallo e Svizzera le massime concentrazioni suggerite nel bioaerosol sono rispettivamente 750 ufc/m³, 10.000 ufc/m³, 500 ufc/m³ e 1000 ufc/m³ (De Aquino Neto et al., 2004; IFA, 2004; Pegas et al., 2010; SUVA, 2007).

Se si fa riferimento anche al più restrittivo di questi valori, le concentrazioni fungine rilevate nei campioni di aria esaminati, risultano piuttosto basse. Il mancato superamento di questi ipotetici limiti, non esclude tuttavia che la presenza di spore all'interno della scuola possa aver costituito un importante fattore di sensibilizzazione dei bambini esposti, anche in considerazione delle condizioni di più elevata sensibilità da parte di questa fascia di popolazione.

Una concentrazione elevata di spore negli ambienti *indoor* è normalmente associata a condizioni di elevata umidità relativa e scarsa ventilazione; le condizioni ottimali per lo sviluppo dei funghi sono costituite da una temperatura compresa tra i 18°C e i 32 °C e da un'umidità relativa superiore al 65%.

Dall'esame dei dati si evincono condizioni microclimatiche buone e comunque tali da non supportare una marcata crescita fungina e ciò è coerente con i risultati ottenuti.

Le macchie di umidità rilevate in seguito all'ispezione visiva sono, evidentemente, tracce pregresse di infiltrazioni di acqua. Sarebbe da chiarire quanto possano influire sulla qualità dell'aria delle aule. Tuttavia, in queste evenienze, è necessario procedere alla rimozione degli intonaci fino a ritrovare il vivo della muratura. Infatti, le ife fungine, in caso di importanti infiltrazioni, penetrano all'interno dei materiali edilizi e la sola eliminazione della superficie esterna potrebbe non risolvere il problema anche dopo sanificazione. La loro persistenza sugli intonaci delle strutture murarie infatti non significa che ife, spore o conidi non possano periodicamente disperdersi nell'aria e rappresentare una fonte di rischio per la salute della scolaresca.

Bibliografia

- [1] Bayer, C.W., 2001. ASHRAE Looks at School IAQ. *Western HVACR News*.
- [2] Bonadonna, L., Briancesco, R., Brunetto, B., Coccia, A.M., De Gironimo, V., Della Libera, S., Fuselli, S., Gucci, P.M.B., Iacovacci, P., Lacchetti, I., La Rosa, G., Meloni, P., Paradiso, R., Pini, C., Semproni, M. per il Gruppo di Studio Nazionale sull'Inquinamento *Indoor*, 2013. Strategie di monitoraggio dell'inquinamento di origine biologica dell'aria in ambiente *indoor*, ed. *Istituto Superiore di Sanità, Rapporti Istisan 13/37, Roma. ISSN 1123-3117*.
- [3] Conferenza Stato Regioni, Ministero della Salute. Piano nazionale della Prevenzione 2010/2012.
- [4] De Aquino Neto, F.R., de Góes Siqueira, L.F., 2004. Guidelines for indoor air quality in offices in Brazil. *Proc. Healthy Build.* 4, 549–54.
- [5] Didwania, N., Joshi, M., 2013. Mycotoxins: A critical review on occurrence and significance. *Int. J. Pharm. Pharmaceutical Sci.*, 5, 1005-10.
- [6] Douwes, J., Thorne, P., Pearce, N., Heederik, D., 2003. Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann. Occup. Hyg.*, 47(3), 187-200.
- [7] Flaherty, D.K., Deck, F.H., Cooper, J., Bioshop, K., Wintenburger, P.A., Smith, L.X., Bynum, L., Witmer, W.B., 1984. Bacterial endotoxin isolated from a water spray air humidification system as putative agent of occupation-related disease. *Infect. Immun.*, 43(1), 206-12.
- [8] Ghosh, B., Lal, H., Srivastava, A., 2015. Review of bioaerosols in indoor environment with special reference to sampling, analysis and control mechanisms. *Environ. Int.* 85, 254-72.
- [9] Immonen, J., Meklin, T., Taskinen, T., Nevalainen, A., Korppi, M., 2001. Skin Prick Test findings in students from moisture and mould damaged schools: A three-year follow – up study. *Pediatr. Allergy Immunol.*, 12, 87-94.
- [10] Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA), 2004. Verfahren zur Bestimmung der Bakterienkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz (#9430). Erich Schmidt Verlag, Berlin, Germany.
- [11] Kanaani, H., Hargreaves, M., Ristovski, Z., Morawska, L., 2008. Deposition rates of fungal spores in indoor environments, factors effecting them and comparison with non-biological aerosols. *Atmosph. Envir.*, 42(30),

7141-54.

- [12] Ministero della Salute, 2010. Linee di indirizzo per la prevenzione nelle scuole dei fattori di rischio indoor per allergie e asma. Centro per la prevenzione e controllo delle malattie. Direzione Generale della Prevenzione Sanitaria, Ministero della salute, Uff. II, Roma.
- [13] Papuas, G.P., Herbert R.J., Henderson W., 2000. The respiratory effects of volatile organic compounds. *Int. J. Occup. Environ. Health*, 6, 1-8.
- [14] Pegas, P.N., Evtugina, M.G., Alves, C.A., 2010. Outdoor/indoor air quality in primary schools in Lisbon: a preliminary study. *Quim Nova* 33, 1145–9.
- [15] Ravelo Abreu, A., Rubio, A.C., Gutiérrez, F.A.J., De la Torre, H.A., 2010. Ochratoxin A in foods for human consumption: review. *Nutricion hospitalaria*, 26(6), 1215-26.
- [16] Sharpe, R. A., Bearman, N., Thornton, C. R., Husk, K., & Osborne, N. J., 2015. Indoor fungal diversity and asthma: a meta-analysis and systematic review of risk factors. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 135(1), 110-22.
- [17] SUVA, 2007. Grenzwerte am Arbeitsplatz 2007, Luzern, Switzerland.
- [18] Swan, J.R.M., Kelsey, A., Crook, B., Gilbert, E.J., 2003. Occupational and environmental exposure to bioaerosols from composting and potential health effects — a critical review of published data. The Composting Association and Health and Safety Laboratory for the Health and Safety Executive 2003. Research Report 130.
- [19] Taskinen, T., Laitinen, S., Meklin, T., Husman, T., Nevalainen, A., Korppi, M., 2000. Skin test and serum Ig E reactions to moulds in relation to exposure in children, in: Seppänen O., Säteri J. (Eds.), *Proceedings of Healthy Buildings 2000*, Finland, vol. 1, pp. 233-8.
- [20] Walsh, T.J., Anaissie, E.J., Denning, D.W., Herbrecht, R., Kontoyiannis, D.P., Marr, K A., Morrison, V.A., Segal, B.H., Steinbach W.J., Stevens, D.A., van Burik, J. A., Wingard, J.R., Patterson T.F., 2008. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.*, 46(3), 327-60.
- [21] White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: Innis, M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press Inc., New York, pp. 315-322.
- [22] WHO Regional Office for Europe, 2009. Guidelines for indoor air quality: dampness and mould. Heseltine, E., Rosen, J. (Eds.). Copenhagen, Denmark. ISBN 978-92-890-4168-3.
- [23] Żukiewicz-Sobczak, W., Sobczak, P., Imbor, K. 2012. Fungal hazards in buildings and flats – impact on the human organism. *MONZ*, 18, 141-6.
- [24] Żukiewicz-Sobczak, W.A., 2013. The role of fungi in allergic diseases. *Postep Derm Alergol.*, 30(1), 42-5.