

NAČELA UTVRĐIVANJA MIKROBIOLOŠKE KAKVOĆE ZRAKA

SINIŠA PAVIĆ, MLADEN SMOLJANOVIĆ,
IVAN MIJAKOVIĆ, KATJA ĆURIN
I MERI PRODAN-BEDALOV

*Zavod za javno zdravstvo Županije
splitsko-dalmatinske, Split, Hrvatska*

Od tri temeljna fiziološko-ekološka čimbenika bitna za egzistiranje i zdravstveno stanje populacije (zrak, voda i hrana), zrak je svakako najvažniji medij. Pored toga, kondicionirani ili nekondicionirani zrak temeljni je medij u brojnim medicinskim, biotehničkim i drugim procesima koje je razvio čovjek. Pored navedenog, epidemiološka kazuistika, kako u nas tako i u ostalim europskim zemljama upućuje na to da su respiratorne bolesti kod kojih je zrak temeljni medij prijenosa tradicionalno na prvome mjestu što se tiče ukupnog pobola populacije od infektivnih bolesti (1, 2).

Dio biologije koji se bavi pojavom različitih bioloških entiteta u zraku naziva se aerobiologijom, a mikrobiologija zraka bavi se pojavom i izolacijom različitih mikroorganizama iz zraka u zatvorenom i otvorenom prostoru (3). Ovisno o vrsti mikrobnog agensa u zraku, u ljudi, životinja, biljaka ili na različitim materijalima mogući su različiti patološki učinci odnosno štete. To su najčešće infekcija, iritacija i alergijske reakcije ljudi i životinja, kao i razgradnja materijala i stvaranje neugodnog mirisa u okolišu. Bakterijski endotoksini mogu izazvati kašalj, glavobolju, groznicu, slabost, bol u mišićima, mučninu i respiratorne teškoće. Slične simptome izazivaju i mikotoksini kao toksični metaboliti plijesni (mikotoksikoze). Virusi i protozoa izazivaju infekcije, a protozoa i česte reakcije preosjetljivosti (4-21).

PRIJENOS I PREŽIVLJANJE MIKROORGANIZAMA U ZRAKU

Različite ljudske aktivnosti, ali i prirodne pojave izravno utječu na nastanak tzv. bioaerosola odnosno sitnijih ili krupnijih mikrokapljica ili čestica koje mogu nositi određenu mikrobnu populaciju (21).

Nastajanje bioaerosola te prijenos i preživljavanje mikroorganizama u zraku složeni je proces na koji utječu različiti fizikalno-kemijski čimbenici od kojih valja posebno istaknuti relativnu vlagu (RV), temperaturu, koncentraciju kisika, ioniziranost zraka i sunčevu radijaciju.

Čestice odnosno aerosoli načelno se nalaze u dva agregatna stanja: u krutom i tekućem. Povećanjem relativne vlage raste i količina raspoložive slobodne vode i njezin aktivitet (a_w) koji je temeljni čimbenik preživljavanja i metaboliziranja mikroorganizama. Sušenje aerosola ima za posljedicu promjenu konformacije dvoslojnih plazminih fosfolipidnih membrana mikrobnih stanica koje iz kristalične prelaze u gel-fazu, što rezultira smanjenom sposobnošću resorpcije i ekskrecije odnosno preživljavanja stanice. Tlak vodene pare odnosno relativne vlage u izravnoj je svezi s temperaturom pa je učinke ovih dvaju čimbenika na mikrobnu stanicu veoma teško odvojiti. Porast temperature ima za posljedicu smanjenje preživljavanja mikroorganizama u zraku. Jedan od temeljnih čimbenika stabilnosti aerosola je koncentracija kisika. Postoji negativna korelacija između koncentracije kisika u atmosferi, odnosno slobodnih kisikovih radikala i stupnja preživljavanja mikroorganizama (21).

Inaktivaciju aerosola izazivaju i različite vrste elektromagnetskog zračenja ovisno o valnoj duljini i intenzitetu ozračivanja. Elektromagnetsko zračenje nižih valnih duljina ima više energije, pa je pogubnije za mikrobnu populaciju u bioaerosolu. Kratkovalno zračenje poput rendgenskih ili gama zraka uz određenu RV, a_w , koncentraciju O_2 i ostalih plinova u zraku (te starost aerosola) oštećuje DNK mikroorganizama s gubitkom virulencije ili pak sposobnosti preživljavanja.

Različiti spojevi ili pak plinovi kao što su NO_2 , SO_2 , O_3 , CO, HF, C_2H_2 također mogu djelovati mikrobicidno. Otapanjem kiselih radikala u vlazi zraka snižava se pH aerosola, što može također imati za posljedicu redukciju nazočne mikroflora.

Zanimljiva su opažanja o varijacijama u koncentraciji i preživljavanju mikroorganizama ovisno o dnevnoj insolaciji ili pak godišnjem dobu. Istraživanja su pokazala da je koncentracija aerosola najmanja zimi, dok je najviša u kasno proljeće i sredinom ljeta (21).

BAKTERIJE U AEROSOLU

Među najpoznatijim uzročnicima respiratornih bolesti bakterijske etiologije koji se šire kapljično jesu uzročnici tuberkuloze, legionarske bolesti, streptokokoza i mikoplazme. Sposobnost preživljavanja bakterija u aerosolu u izravnoj je svezi s vrstom i građom uzročnika, njegovim fiziološkim stanjem, kao i temeljnim ekološkim parametrima koji vladaju u aerosolu ili oko njega. Temeljni čimbenici stabilnosti bakterija u aerosolu su: relativna vlaga, temperatura, koncentracija O_2 , CO_2 , sunčeva svjetlost, sušenje ili

ovlaživanje, smrzavanje i sl. (22-27). Valja naglasiti da su za razliku od vegetativnih stanica bakterijske spore bitno rezistentnije na nepovoljne čimbenike koji djeluju u aerosolu.

VIRUSI U AEROSOLU

Pri uobičajenim uvjetima, virusi u aerosolu osjetno su rezistentniji na inaktivaciju kisikom od vegetativnih bakterijskih oblika. U svezi s preživljavanjem odnosno inaktivacijom virusi s lipidnim ovojnicama u strukturi kapside osjetno su stabilniji pri niskoj RV, dok su virusi bez lipidnih struktura u kapsidi osjetno stabilniji pri visokim vrijednostima RV. Ako nakon uzorkovanja zraka neki aktivni virus više ne može biti dokazan, njegov genom (DNK ili RNK) još može biti nazočan u aerosolu što dokazuje da inaktivacija virusa ne počiva na razgradnji genoma, nego na oštećenju kapside. Opaženo je nadalje da se vlaženjem zraka tijekom uzorkovanja može povećati stupanj izolacije virusa kojima nedostaju lipidi u kapsidi. Iako postoje virusi čija je osjetljivost u izravnoj ovisnosti o RV, koncentraciji O₂ i temperaturi ipak postoje i oni koji u aerosolu preživljavaju u veoma široku rasponu ovaih triju temeljnih ekoloških faktora (28-35).

FAGI U AEROSOLU

Kao i u slučaju drugih virusa, fage u aerosolu ne inaktivira kisik, nego su temeljni čimbenici stabilnosti odnosno inaktivacije RV, koncentracija iona, smrzavanje, vlaženje prije uzorkovanja, temperatura i različiti kemijski spojevi. Inaktivacija faga u aerosolu uglavnom je posljedica loma spoja između glave i repa faga, što se često događa prilikom uzorkovanja pa se načelno prije samog uzorkovanja preporuča vlaženje zraka (21).

PLIJESNI I MIKOTOKSINI U AEROSOLU

Unatoč činjenici da oko 100.000 do danas poznatih kvasaca i plijesni u zdrave populacije ne izaziva bolesti, stanovite plijesni i kvasci, kao i njihovi metaboliti kod osjetljivih ili imunokompromitiranih osoba mogu izazvati osjetne zdravstvene teškoće: mikoze, kandidijazu, astmu, reakcije alergijskog tipa kao i ozbiljne respiratorne teškoće. Određene plijesni sintetiziraju mikotoksine koji, ako se inhaliraju u visokoj koncentraciji (djelatnici na farmama, u silosima žitarica ili pohranjenim usjevima), mogu izazvati mikotoksikoze s teškim zdravstvenim tegobama.

Pojava kvasaca ili plijesni u aerosolu posljedica je otpuštanja njihovih spora. Preživljavanje plijesni ovisno je o koncentraciji slobodne vode (a_w) i prisutnih hranjivih tvari potrebnih za rast i razmnožavanje. Istraživanja su pokazala da plijesni roda *Aspergillus* pri temperaturi od 25 do 30 °C imaju najniže vrijednosti a_w od 0,75 do 0,84; *Eurotium spironolakton* pri istim temperaturama rastu do a_w od 0,70 do 0,71 dok *Mucor circinelloides* zahtijeva a_w od 0,90. *Penicillium chrysogenum* i *Penicillium griseofulvum* rastu do a_w od 0,79 do 0,81 a *Risophus stolonifer* pri a_w od 0,84.

Mikotoksini su sekundarni metaboliti različitih plijesni toksični za ljude i životinje. Neki mikotoksini kao npr. lizergična kiselina derivati su aminokiselina, a aflatoksin, zearalenon i grizeofulvin su derivati aromatičnih i fenolnih spojeva. U skupinu terpenoidnih mikotoksina pripadaju trihoteceni i fusidani. Plijesni roda *Penicillium* odgovorne su za sintezu patulina, citrinina, okratoksina A, citroviridina, emodina, gliotoksina, verakulogena i sekalonske kiseline. *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* sintetiziraju kancerogeni aflatoksin B1, dok *Aspergillus versicolor* i *Aspergillus ochraceus* sintetiziraju sterigmatocistin odnosno okratoksin A. *Strachybotrys chartarum* odgovorna je za sintezu trihotecena s više od 70 poznatih derivata, kao i T2-toksina, nivalenola, deoksinivalenola, satratoksina H i spirolaktone. *Fusarium sp.* produciraju zearalenon, dok *Claviceps sp.* sintetiziraju ergot alkaloidne (36-45).

ENDOTOKSINI U AEROSOLU

Gram-negativne bakterije ubikvitarni su kontaminanti ljudskih i životinjskih fekalija, tla, prašine i vode odnosno različitih poljoprivrednih proizvoda i usjeva s kojih dospjevaju u bioaerosole. Raspadom bakterija, ugibanjem pod litičkim djelovanjem faga, razgradnjom uvjetovanom fagocitozom uz eliminaciju fagosomima, kao i pri dijeljenju stanica, oslobađaju se dijelovi staničnih stijenki koje nazivamo endotoksinima. Endotoksini se sastoje od tri temeljne strukture, i to O-specifičnih polisaharida, strukturnih polisaharida ili polisaharida srži. Valja naglasiti da je temeljna struktura koja je u svezi s patofiziološkim učincima endotoksina lipid A (46-50).

Zbog prije navedene ubikvitarnosti prirode Gram-negativnih bakterija, pojava endotoksina vezana je uz različite ljudske aktivnosti. Endotoksini su dokazani u aerosolima iz područja bogatih prašinom organskog podrijetla, osobito s poljoprivrednih površina ili prerade poljoprivrednih proizvoda. Posebno su proučeni i kvantificirani tzv. Limulus amebocyte lysate testovi (LAL) (51) u materijalima i aktivnostima vezanim uz pohranu žitarica, silaže, slame, sijena, kompostiranih drvenih materijala, staja, slagališta drvene građe, sirovog i baliranog pamuka, u svinjcima i peradarskim farmama, proizvodnji stočne hrane, kao i u različitim biotehničkim procesima.

U biološkom smislu endotoksini snažno reagiraju s ljudskim imunim sustavom na humoralnom i celularnom nivou. Aktiviraju komplement i sustav zgrušavanja krvi, reagiraju s brojnim stanicama kao što su bazofili, mastociti, endotelne stanice, makrofagi, trombociti, polimorfonuklearni leukociti i T i B-limfociti (52).

UZORKOVANJE I ANALIZA MIKROORGANIZAMA IZ ZRAKA

Od početka 20. stoljeća pred mikrobiologe se postavlja zadatak uzorkovanja i ispitivanja mikrobiološke kakvoće zraka odnosno bioaerosola. Ova su ispitivanja od posebne važnosti u medicini (infektologija, epidemiologija, javno zdravstvo), veterini, poljoprivredi, biotehnologiji, industriji, kućanstvima, ali i pri vojnim aktivnostima (53, 54).

Cilj mikrobiološkog uzorkovanja zraka je učinkovito izdvojiti kapljice bioaerosola sa

suspendiranom mikroflorom bez izazivanja štetnih utjecaja na nazočne mikroorganizme. Aktualne mikrobiološke tehnike razlikuju tri temeljna postupka uzorkovanja.

Sudar i atherencija

Načelo ovog postupka je usisavanje točno određenog volumena zraka tijekom određenog vremena. Struja usisanog zraka usmjerava se na površinu krutoga mikrobiološkog hranilišta ili na površinu podloge s posebnom athezivnom tvari, pri čemu dolazi do sraza kapljica aerosola ili pak krutih čestica onečišćenih mikroorganizmima s hranjivom podlogom. Zbog relativno visokog površinskog a_w , mikroorganizmi prilikom sudara atheriraju na površinu hranilišta koje se zatim inkubira propisano vrijeme pri odgovarajućoj temperaturi. Isti proces događa se i pri sudaru mikroorganizama s podlogom presvučenom atherirajućom tvari nakon čega se atherirana mikroflora detektira mikroskopski. Mikroflora porasla na krutom hranilištu diferencira se i kvantificira preračunavanjem na m^3 zraka (55, 56).

Sraz s tekućinom

Ova je tehnika slična tehnici sudara i atherencije s tim da se struja zraka s bioaerosolom uvodi u tekuću podlogu (najčešće puferirani diluens). Usisani mikroorganizmi u tekućini se relativno lako dispergiraju stimulirani mikromjehurićima zraka. Prednost ovog postupka je u tome što se s tekućim medijem mogu načiniti decimalna razrjeđenja i presijavanja na različita selektivna ili neselektivna hranilišta (57-60).

Filtracija

Ovaj se postupak temelji na uporabi posebnih filtara promjera 25, 37 ili 47 mm s promjerom pora od 0,01 do 10,0 μm koji se također postavljaju u uređaje za aspiraciju zraka. Kapacitet propusnosti zraka kreće se između 1 i 50 L/min (61). Najčešća tvoriva od kojih su načinjeni ovi filtri su polikarbonati, miješani esteri celuloze ili polivinil klorid. Nakupljanje čestica odnosno aerosola ovisno je o njihovim fizikalnim karakteristikama (veličina, oblik i gustoća) te o veličini pora filtara, kao i o protoku usisanog zraka. Deponiranje aerosola na površinu filtara pod utjecajem je čimbenika kao što su sile ubrzanja, presretanja, sraza, difuzije, ali i elektrostatskog privlačenja odnosno odbijanja. Mikroflora prikupljena na filtru može se uzgojiti tako da se filter postavi na prikladnu hranjivu podlogu ili da se nakupljena mikroflora spere s površine filtra te presije na odgovarajuća selektivna i neselektivna hranilišta.

Pored navedenih postupaka u praksi se još ponegdje primjenjuje i tzv. gravitacijski postupak koji se temelji na eksponiranju selektivnih ili neselektivnih hranilišta u definiranim prostorima određenog vremena. Kako učinkovitost ovog postupka ovisi o taloženju samo krupnijih čestica odnosno aerosola, i to samo pod djelovanjem sile gravitacije (čestice promjera manjeg od 10 μm načelno u mirnom zraku ne sedimentiraju), kao i zbog činjenice da se rezultati ne mogu interpretirati ni kvalitativno ni kvantitativno, ovu tehniku uzorkovanja valja napustiti (62).

Od suvremenih tehnika molekularne biologije postupak detekcije lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) pruža posebne pogodnosti u identifikaciji i najosjetljivijih mikroorganizama u zraku.

INTERPRETACIJA MIKROBIOLOŠKIH NALAZA - PROBLEM NEPOSTOJANJA STANDARDA

Za razliku od mikrobioloških standarda u svezi voda za piće ili namirnica kao i standarda o kemijsko-toksikološkoj kakvoći zraka (63, 64) donedavno u našoj zemlji nisu postojali nikakvi standardi ili propisi o mikrobiološkoj kakvoći zraka. Promjena nastaje Pravilnikom o dobroj proizvođačkoj praksi (65) u kojem su propisani mikrobiološki standardi za zrak u proizvodnji sterilnih proizvoda i pripravaka. Iako valja pozdraviti prvi korak u uspostavi regulative u svezi s mikrobiološkim kriterijima za veoma osjetljivu proizvodnju kao što je proizvodnja lijekova i drugih medicinskih pripravaka koji se rade u sterilnim uvjetima, ističemo potrebu izrade i drugih kriterija mikrobiološke kakvoće zraka u različitim djelatnostima koje su od posebne važnosti s motrišta javnog zdravstva. Prema nama dostupnim podacima u europskim zemljama i u SAD-u mikrobiološki standardi, norme ili makar preporuke odnose se na sljedeća područja, sektore, odnosno aktivnosti (21):

- identifikacija virusa u zraku pogona za obradu otpadnih voda s pomoću kolifaga
- postupak uzorkovanja zraka u javnim i privatnim zgradama tijekom izvanrednih situacija
- mikrobiološko ispitivanje komora s laminarnim strujanjem zraka i kabineta za ispitivanje biološki opasnih tvari
- uzorkovanje, prikupljanje i prijevoz virusa kao patogenih kontaminanata u zatvorenim prostorima
- uspostava mikrobioloških standarda za zrak u zatvorenim prostorima
- preporučeni postupci za uzorkovanje zraka
- procjena živih mikroorganizama u zraku privatnih i javnih zgrada, smjernice za prikupljanje gljivica (plijesni i kvasci) u zraku zatvorenih prostora
- mikrobiološko testiranje aerosola u pogonima za obradu otpadnih voda
- praktične upute za sprječavanje hospitalnih infekcija
- učinkovito vrednovanje dezinfekcije aerosola
- sugestije o obuci bolničkih timova s odjela visokog rizika u primjeni higijenskih načela
- saniranje epidemija u bolnicama i javnim zgradama
- detekcija *Aspergillus spp.* pri invazivnim hospitalnim aspergilozama
- mikrobiološko uzorkovanje zraka u čistim prostorijama i na odjelima visokog rizika
- vrednovanje uređaja za mikrobiološko uzorkovanje zraka te usklađenost akta prema EN 45001
- odabir položaja uređaja za uzorkovanje zraka unutar zatvorenog prostora
- utvrđivanje površinske mikrobne kontaminacije

- obuka timova za higijenu namirnica i mlijeka u mikrobiološkoj higijeni zraka i radnih površina
- nadzor nad kontaminacijom zraka iz okoliša prema načelima “obiteljsko društvo”
- procjena metoda nadzora nad okolišem u farmaceutskoj industriji
- mikrobiološki nadzor nad okolišem: referentna lista nazivlja
- plan uzorkovanja zraka u obliku nadzornog formulara
- mikrobiološko-higijenski nadzor u javnom prijevozu: avionski prijevoz, vlakovi, autobusi i podzemna željeznica
- mikrobiološko-higijenski nadzor u pogonima prerade mlijeka
- statistika pri mikrobiološkom uzorkovanju zraka
- mikrobiološko-higijenski nadzor u prehrambenoj industriji
- mikrobiološki nadzor nad zrakom i radnim površinama u svrhu primjene HACCP u rizičnim područjima
- mikrobiološki nadzor nad vodom s pomoću koliforma i *E. coli*
- mikrobiološki nadzor čistoće ruku
- nadzor nad bioaerosolima u pogonima za proizvodnju vakcina, biološki opasnih tvari i biotehnologiji
- “surfair” atlas mikrobioloških hranilišta
- popis međunarodnih standarda o klasifikaciji zraka
- uporaba kompjutorskog softwera u primjeni “dobre laboratorijske prakse” pri nadzoru zraka
- bakteriološki rat: uzorkovanje bioaerosola
- uzorkovanje bioaerosola u peradarskim farmama
- vrednovanje uređaja za uzorkovanje zraka SAS SUPER 90 s pomoću anemometra u zračnom tunelu
- test učinkovitosti uređaja za uzorkovanje zraka u istraživačke svrhe
- pokusi iz higijene namirnica i okoliša za studente
- pasivno uzorkovanje zraka s pomoću mikrobnog indeksa zraka prema Pitzurri
- mikrobiološka kakvoća zraka u pogonima za preradu mesa
- mikrobiološki nadzor nad okolišem u kozmetičkoj industriji
- mikrobiološko ispitivanje površine trupova zaklanih životinja
- biološke performanse za HVAC (engl. *heating, ventilation, air conditioning*) u proizvodnji sterilnih lijekova i medicinskog pribora
- mikrobiološko uzorkovanje zraka u čistim prostorijama bez rukovaoca uređaja za uzorkovanje
- HVAC i “čiste prostorije”
- standardni postupci uzorkovanja mikroorganizama iz zraka u pogonima za obradu otpada prema ASTM
- onečišćenje zraka u zatvorenom prostoru uvod u zdravstvene probleme zaposlenih izazvane biološkim onečišćenjem
- biološki zagađivači u tvom domu
- što je “dobra higijenska praksa u mljekarstvu”

ZAKLJUČAK

Rezimirajući iznesenu problematiku u svezi s tehnikama uzorkovanja, kao i propise, standarde i preporuke o mikrobiološkoj kakvoći zraka, vidimo da se svjetski propisi, standardi i preporuke odnose na područja javnog zdravstva, farmaceutske proizvodnje, kozmetike, biološki opasnih pripravaka i vakcina, poljoprivredne proizvodnje i hrane, mljekarstva, zagrijavanja-ventilacije-kondicioniranja zraka (HVAC), pogone za obradu otpadnih voda, bolnice/klinike, mikrobiološke laboratorije, izobrazbu, čiste prostorije, kriterije za potrebe vojske i dezinfekciju. Kao što smo već naveli aktualni normativni akti u nas propisuju samo mikrobiološke kriterije u proizvodnji medicinskih pripravaka što smatramo nedovoljnim. Mislimo da bi u javnozdravstvenu legislativu naše zemlje, ali i u propise koji se odnose na sve druge relevantne sektore i djelatnosti, trebalo što prije ugraditi svjetski prihvaćene norme o mikrobiološkoj kakvoći ovog temeljnog fiziološko-ekološkog medija.

Zahvala

Želimo zahvaliti dipl. inž. M. Koščecu iz tvrtke "Tamiko instruments", Zagreb, kao i tvrtki "PBI International" iz Milana na pomoći koju su nam pružili u prikupljanju aktualnih međunarodnih standarda i propisa u svezi s mikrobiološkom kakvoćom zraka.

LITERATURA

1. Baršić S, Shönwald S, Car V. Bilten časopisa *Pharmacia* 1985:4.
2. World Health Organization (WHO). Surveillance of acute respiratory infections (ARI). *Wkly Epidemiol Rec* 1984;49:380.
3. Stetzenbach LD. Introduction to aerobiology. In: *Manual of environmental microbiology*. Washington (DC): American Society for Microbiology; 1997. p. 619-24.
4. Bernstein IL, Safferman RS. Clinical sensitivity to green algae demonstrated by nasal challenge and *in vitro* tests of immediate hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 1973;51:22-8.
5. Brown RM, Larson DA, Bold HC. Airborne algae: their abundance and heterogeneity. *Science* 1964;143:583-5.
6. Burrell R. Microbiological agents as health risk in indoor air. *Environ Health Perspect* 1991;95: 29-34.
7. Castellan RM, Olenchock SA, Hankinson JL, et al. Acute bronchoconstriction induced by cotton dust: dose-related response to endotoxin and other dust factors. *Ann Intern Med* 1984;101: 157-63.
8. Alvarez AJ, Buttner MP, Toranzos GA, et al. The use of solid-phase polymerase chain reaction for the enhanced detection of airborne microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 1994;60: 374-376.

9. Cole EC, Foarde KK, Leese KE, Green DA, Franke GL, Berry MA. Assessment of fungi in carpeted environments. In: Simons RA, Flanigan B, Verhoeff AP, Adam OCG, Hoekstra ES, editors. Health implication of fungi in indoor environments. Air quality monographs. Volume 2. Amsterdam: Elsevier; 1994. p. 103-28.
10. Lacey J, Crook B. Fungal and actinomycete spores as pollutants of the workplace and occupational allergens. *Ann Occup Hyg* 1988;32:515-33.
11. Bernstein RS, Sorenson WG, Garabrant D, Reaux C, Treitman RD. Exposure to respirable, airborne Penicillium from a contaminated ventilation system: clinical, environmental and epidemiological aspects. *Am Ind Hyg Assoc J* 1983;44:161-9.
12. Croft WS, Jarvis BB, Yatawara CS. Airborne outbreak of trichothecene toxicosis. *Atmo's Environ* 1986;20:549-52.
13. Land CJ, Hult K, Fuchs R, Hagelberg S, Lundstrom H. Thermogenic mycotoxins from *Aspergillus fumigatus* as a possible occupation health problem in sawmills. *Appl Environ Microbiol* 1987;53:787-90.
14. Sorenson WG, Frazer DG, Jarvis BB, Simpson J, Robinson VA. Trichothecene mycotoxins in aerosolized conidia of *Stachybotrys atra*. *Appl Environ Microbiol* 1987;53:1370-5.
15. Adams DJ, Spendlove JC, Spendlove RS, Barnett BB. Aerosol stability of infectious and potentially infectious reovirus particles. *Appl Environ Microbiol* 1982;44:903-8.
16. Brenner KP, Scarpino PV, Clark SC. Animal viruses, coliphages and bacteria in aerosols and wastewater at a spray irrigation site. *Appl Environ Microbiol* 1988;54:409-15.
17. Fannin KF, Vana SC, Jakubowski W. Effect of an activated sludge wastewater treatment plant on ambient air densities of aerosols containing bacteria and viruses. *Appl Environ Microbiol* 1985;49:1191-6.
18. Fattal B, Katzenelson E, Guttman-Bass, Sadovski A. Relative survival rates of enteric viruses and bacterial indicators in water, soil, and air. *Monogr Virol* 1984;15:184-92.
19. Sawyer MH, Chamberlain CJ, Wu YN, Aintablian N, Wallace MR. Detection of Varicella zoster virus DNA in air samples from hospital room. *J Infect Dis* 1994;169:91-4.
20. Teltsch B, Katzenelson E. Airborne enteric bacteria and viruses from spray irrigation with wastewater. *Appl Environ Microbiol* 1978;35:290-6.
21. Mohr AJ. Fate and transport microorganisms in air. In: *Manual of environmental microbiology*. Washington (DC): American Society for Microbiology; 1997. p. 641-8.
22. Bridge BA. Survival of bacteria following exposure to ultraviolet and ionising radiation. *Soc Gen Microbiol* 1976; 26:183-208.
23. Cox CS, Baldwin F. The toxic effect of oxygen upon the aerosol survival of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 1967;49:115-7.
24. Cox CS, Baxter J, Maidment BJ. A mathematical expression for oxygen-induced death in dehydrated bacteria. *J Gen Microbiol* 1973;75:179-85.
25. Hatch MT, Dimmick RL. Physiological response of airborne bacteria to shifts in relative humidity. *Bacteriol Rev* 1966;30:597-603.
26. Israeli E, Gitelman J, Lighthart B. Death mechanisms in bioaerosols. In: Lighthart B, Mohr JB, editors. *Atmospheric microbial aerosols*. New York (NY): Chapman & Hall; 1994. p. 166-91.
27. De Mik G, de Groot I. The germicidal effect of the open air in different parts of the Netherlands. *J Hyg (Cambridge)* 1977;78:175-87.
28. Akers TG, Bond S, Goldberg LJ. Effect of temperature and relative humidity on the survival of airborne Colombia SK group viruses. *Appl Microbiol* 1966;14:361-5.
29. Akers TG, Hatch TM. Survival of a picorna virus and its infectious RNA after aerosolization. *Appl Microbiol* 1968;16:1811-3.
30. Adams DJ, Spendlove JC, Spendlove RS, Barnett BB. Aerosol stability of infectious and potentially infectious reovirus particles. *Appl Environ Microbiol* 1982;44:903-8.
31. Harper GJ. The influence of environment of the survival of airborne virus particles in the laboratory. *Arch Gesamte Virusforsch* 1963;13:64-71.

32. May KR, Druett HA, Packman LP. Toxicity of open air to a variety of microorganisms. *Nature (London)* 1969;221:1146-7.
33. Mayhew CJ, Zimmerman WD, Hahon N. Assessment of aerosol stability of yellow fever virus by fluorescent - cell counting. *Appl Microbiol* 1968;16:263-6.
34. Miller WS, Artenstein MS. Aerosol stability of three acute respiratory disease viruses. *Exp Biol Med* 1967;125:222-7.
35. Moe K, Harper GJ. The effect of relative humidity and temperature on the survival of (calf) bovine rotavirus in aerosol. *Arch Virol* 1983;76:211-6.
36. Benaim-Pinto C. Sensation to basidiomycetes and to *Fuligo septica* (Myxomycetae) in venezuelan atopic patients suffering from respiratory allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:282-9.
37. Burge HA. The fungi. In: Morely P, Feeley J, Otten J, editors. *Biological contaminants in indoor environments*. Philadelphia (PA): American society for testing and materials; 1990. p. 136-62.
38. Burge HA. Bioaerosols: prevalence and health effects in the indoor environment. *J Allergy Clin Immunol* 1990;86:687-701.
39. Butcher BT, O'Neil CE, Reed MA, Altman LC, Lopez M, Lehrer SB. Basidiomycete allergy: measurement of spore-specific IgE antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 1987;80:803-9.
40. Carroll GC, Wicklow DT. *The fungal community, its organisation and role in the ecosystem*. New York (NY): Marcel Dekker; 1992.
41. Ciegler A, Burmeister HR, Vesonder RF, Hesseltine CW. Mycotoxins: occurrence in the environment. In: Shank RC, editor. *Mycotoxins and N-nitroso compound environmental risk*. Vol 1. Boca Raton (FL).
42. Corrier DE. Mycotoxicosis: mechanism of immunosuppression. *Vet Immunol Immunopathol* 1991;30:73-87.
43. Creasia DA, Thurman D, Wannemacher RW Jr., Bunner DL. Acute inhalation toxicity of T-2 mycotoxins in rat and guinea pig. *Fundam Appl Toxicol* 1990;14:54-9.
44. Nevalainen A, Pasanen AL, Niininen M, Reponen T, Jantunen MT, Kalliokoski P. The indoor air quality of Finnish homes with mold problems. *Environ Int* 1991;17:299-302.
45. Samson RA. Occurrence of moulds in modern living and working environments. *Eur J Epidemiol* 1985;1:54-61.
46. Homma JY, Kanegasaki S, Luderitz O, Shiba T, Westphal O. In: *Bacterial endotoxins: chemical, biological and clinical aspects*. Weinheim: Verlag Chemie GmbH; 1984. p. 11-20, 61-76.
47. Douwes J, Versloot P, Hollander A, Heederik D, Doekes G. Influence of various dust sampling and extraction methods on the measurement of airborne endotoxin. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:1763-9.
48. Dutkiewicz J, Tucker J, Burrell R, et al. Ultrastructure of the endotoxin produced by gram-negative bacteria associated with organic dust. *Syst Appl Microbiol* 1992;15:272-85.
49. Flaherty DK, Deck HF, Cooper J, et al. Bacterial endotoxin isolated from a water spray air humidification system as a putative agent of occupation related lung disease. *Infect Immun* 1984;43:206-12.
50. Helander I, Saxen H, Salkinoja-Salonen M, Rylander R. Pulmonary toxicity of endotoxins: comparison of lipopolysaccharides from various bacterial species. *Infect Immun* 1982;35:528-32.
51. Milton DK, Gere RJ, Feldman HA, Greaves IA. Endotoxin measurement: aerosol sampling and application of a new *Limulus* method. *Am Ind Hyg Assoc J* 1990;51:331-7.
52. Morrison DC, Ulevitch RJ. The effect of bacterial endotoxins on host mediation system. *Am J Pathol* 1978;93:527-617.
53. Burge HA, Solomon WR. Sampling and analysis of biological aerosols. *Atmos Environ* 1987;21:451-6.
54. Chatigny MA, Macher MJ, Burge HA, Solomon WR. Sampling airborne microorganisms and aeroallergens. In: Herig SV, editor. *Air sampling instruments for evaluation of atmospheric*

- contaminants. Cincinnati: 7th American Conference of Governmental Industrial Hygienists; 1989. p. 199-220.
55. Grinshpun AS, Chang CW, Nevalainen A, Willeke K. Inlet characteristics of bioaerosol sampler. *J Aerosol Sci* 1994;25:1503-22.
 56. Jensen PA, Lighthart B, Mohr AJ, Shaffer BT. Instrumentation used with microbial aerosol. In: Lighthart B, Mohr AJ, editors. *Atmospheric microbial aerosols, theory and applications*. New York (NY): Chapman & Hall; 1994. p. 226-84.
 57. Juozaitis A, Willeke K, Grinshpun SA, Donnelly J. Impaction onto a glass slide or agar versus impingement into a liquid for the collection and recovery of airborne microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:861-70.
 58. Lee KW, Ramamurthi M. Filter collection. In: Willeke K, Baron PA, editors. *Aerosol Measurement: principles, techniques and applications*. New York (NY): Van Nostrand Reinhold; 1993. p. 179-205.
 59. Nevalainen A, Patuzka J, Liebhaber F, Willeke K. Performance of bioaerosol samplers: collection characteristics and sampler design considerations. *Atmos Environ* 1992;26:531-40.
 60. Terzieva S, Donnelly J, Ulevicius V, et al. Comparison of methods for detection and enumeration of airborne microorganisms collected by liquid impingement. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:2264-72.
 61. Thomps S, Donnelly J, Grinshpun SA, Juozaitis A, Willeke K. Method and test system for evaluation of bioaerosol samplers. *J Aerosol Sci* 1994;25:1579-93.
 62. Butner M, Willeke K, Grinshpun SA. Sampling and analysis of airborne microorganisms. In: *Manual of environmental microbiology*. Washington (DC): American Society for Microbiology; 1997. p. 629-37.
 63. Zastupnički dom Sabora RH. Zakon o zaštiti zraka. *Narodne novine* 1995;(48):1452-8.
 64. Vlada Republike Hrvatske. Uredba o preporučenim i graničnim vrijednostima kakvoće zraka. *Narodne novine* 1996;(101):4198-200.
 65. Ministarstvo zdravstva RH. Pravilnik o dobroj proizvođačkoj praksi. *Narodne novine* 1999;(71):2806-31.

Requests for reprints:

dr. sc. Siniša Pavić, dr. med.
Zavod za javno zdravstvo Županije splitsko- dalmatinske
p.p. 194, 21000 Split