

REZUMAT

Depistarea precoce a bolilor segmentului respirator la oameni și animale, determinarea prevalenței unor factori de risc necunoscuți sau neglijăți până nu demult, precum și stabilirea stării de sănătate a unei colectivități profesionale sau a unui grup țință în corelație cu poluarea fungică a habitatelor au avut la bază, în acest studiu o serie de asociații și ipoteze neexplorate până acum. Testarea individuală, personalizată chiar, face pentru prima dată lumină asupra influenței poluării fungice din spațiile de muncă și locuit, rezultatele investigațiilor căpătând valoare predictivă pentru afecțiunile alergice și non-alergice respiratorii umane și animale. Deși sensibilizarea alergică nu este o boală în sine, cauzele sale merită să fie analizate și descifrate datorită asocierii acestora cu astmul bronșic și cu alte boli, multe dintre acestea destul de grave.

Condițiile eco-biologice unice de microclimat creează premisele dezvoltării fungice, ca urmare a capacității acestora de a se dezvolta în aproape orice condiții. Printre microhabitatele fungice dintr-un spațiu de locuit se numără: recipientele de depozitare a reziduurilor, zonele de depozitare a alimentelor (inclusiv combinele frigorifice), tapetul de vinil, plantele decorative, cărțile (tot ceea ce conține celuloză), ferestrele și zona adiacentă acestora, baia, instalațiile de aer condiționat, aparatura electrocasnică și cea de birou, etc. În general observațiile valabile pentru un microclimat nu se pot extrapola la nivelul altui microclimat, existând mari variații între factorii ce concură la stimularea sau întreținerea dezvoltării fungice „de interior”.

Diversitatea fungică din spațiile de muncă sau locuit a fost mult mai puțin studiată față de cea exterioară ca urmare a existenței unor impedimente nu atât de ordin tehnic cât conjunctural. În parte, putem vorbi de dificultățile întâmpinate în alegerea locațiilor de studiat și de accesul liber în acestea, mai ales când vorbim de locuințe particulare sau punctele de lucru ale unor societăți comerciale. Diagnosticarea și contabilizarea problemelor de sănătate ce pot surveni consecutiv expunerii fungice în spațiile închise poate fi de un real folos în aprecierea relației cauză-efect. Efectele non-alergice ale fungilor, asupra oamenilor și animalelor sunt deosebit de greu de demonstrat de aceea orice indiciu direct sau conjunctural a fost explorat excesiv. Unitățile centrale ale calculatoarelor sunt dotate cu sistem de ventilație pentru răcirea componentelor. Ventilația, chiar la valori joase, contribuie la înlăturarea umezelii dintr-un spațiu. Interiorul echipamentelor dotate cu astfel de sisteme poate deveni în timp, o “**bază de**

date” ce să cuprindă informațiile cele mai relevante despre **“fungii rezidenți”**, dintr-un anumit spațiu la un moment dat. Datorită mecanismelor speciale (rețea glicoproteică) de aderare fungică la componentele calculatoarelor (placi de bază, carcase, paletele ventilatoarelor, etc.) odată cu trecerea aerului prin sistemului de ventilație, datorită încărcării electrice a suprafețelor metalice sau de celuloid are loc electrizarea particulelor fiind facilitată astfel aderarea, urmată de supraîncălzirea calculatoarelor, ceea ce va conduce în final la scăderea umidității relative în **“zona personală de risc”** a utilizatorului, cu efecte negative asupra sănătății acestuia.

Încărcarea electrostatică este procesul fizic prin care, pe corpuri solide (de exemplu carcase și părți componente ale aparatelor electrice) apar sarcini electrice, datorită unor acțiuni mecanice cum ar fi: frecarea cu aerul, vibrațiile, vecinătatea unor cabluri metalice străbătute de curenți electrice, etc. Problemele tipice cauzate de încărcarea electrostatică sunt atracția, aderența și stocarea prafului deci implicit și a sporilor și fragmentelor fungice. Toate acestea vor fi urmate de aerodispersia constantă a particulelor fungice, fiind menținută poluarea în spațiile respective la cote cel puțin îngrijorătoare pentru sănătatea umană dar și animală. Ne-am propus demonstrarea existenței unei **„zone personale de risc”** pentru utilizatorul de calculator personal și a faptului că unitatea centrală a calculatorului poate fi asimilată unei **“baze de date”** ce acumulează și relevă diversitatea speciilor și a genuri fungice existente la un moment dat, în spațiile analizate și în condițiile experimentale impuse. Scopul major al cercetărilor a fost realiza o conexiune directă între gradul de afectare a stării de sănătate și poluarea fungică din spațiile studiate, dintre elementele fungice viabile aeropurtate și cele inhalate, pe unitatea de timp prin aprecierea cantitativă, calitativă alături de ponderea și distribuția genurilor și speciilor fungice **“rezidente”**. Deasemeni vom recomanda valori ce să reprezinte **limite de “siguranță”** pentru poluarea fungică a spațiilor de muncă și locuit. Dorim ca prin această cercetare adresată indivizilor clinic sănătoși, tineri și imunocompetenți și printr-un amplu **“screening”** multifazic, să **“umplem un gol”** privind înțelegerea mecanismelor de declanșare și instalare ale afecțiunilor respiratorii alergice și non-alergice.

Teza este alcătuită din două părți distincte. **“Stadiul actual al cunoașterii”** prima parte, este redactată pe parcursul a 3 capitole cuprinzând 45 de pagini. În **primul capitol** sunt prezentate succinct o serie de noțiuni privind biologia, morfologia și fiziologia fungică alături de o scurtă clasificare, fiind trecute în revistă principalele particularități ce sunt relevante în raport cu cercetările aeromicologice efectuate. În **capitolul II** sunt prezentate o serie de elemente legate atât de semnificația clinică cât și de factorii ce pot influența prezența anumitor specii și genuri fungice în spațiile de muncă sau locuit, accentul fiind pus pe intercondiționarea dintre factorii ecologici de microclimat și dinamica fungică. Sunt prezentate mecanismele ce

stau la baza aerodispersiei și germinării sporilor și a fragmentelor miceliene în spațiile închise.

În a doua parte a acestui capitol sunt prezentate o serie de date statistice, epidemiologice privind afecțiunile alergice și respiratorii precum și ponderea anumitor specii fungice atât în mediul intraspitalicesc cât și în spațiile de muncă și locuit, fiind prezentate totodată dificultățile întâmpinate de către clinicieni în diagnosticarea infecțiilor de natură fungică. Deasemeni tot în acest capitol sunt prezentate, prin prisma ultimelor descoperiri științifice în domeniul aeromicologiei, ultimele concepte și ipoteze menite să înlesnească înțelegerea mecanismelor de apariție ale alergiilor în corelație cu eco-biologia fungică și activitățile umane desfășurate în spațiile de muncă și locuit. În **capitolul trei** sunt prezentate mecanismele de patogenitate fungică cunoscute până în prezent precum și o serie de particularități ale bolilor respiratorii pe fond alergic ce evoluează atât la om cât și la animale. Partea a 2-a “Cercetări proprii” este redactată pe parcursul a 6 capitole, cuprinzând 152 de pagini. În **capitolul IV** intitulat “Scopul și obiectivele cercetării” sunt prezentate în detaliu principalele direcții de cercetare. Aprecierea cantitativă, calitativă alături de ponderea și distribuția genurilor și speciilor fungice în spațiile de muncă și locuit, demonstrarea existenței „**zonei personale de risc**” pentru utilizatorul de calculator personal și a faptului că unitatea centrală a calculatorului poate fi asimilată unei “**baze de date**” ce acumulează și relevă diversitatea speciilor și a genuri fungice existente la un moment dat, în spațiile analizate sunt doar câteva dintre obiectivele propuse. Recoltarea probelor de aer utilizând în premieră în România un impactor intranasal, evaluarea a două noi tipuri de chestionare și aprecierea stării de sănătate a participanților la studiu, oameni și animale prin utilizarea unor teste serologice și dermice au reprezentat mijloacele prin care ne-am propus realizarea obiectivelor enunțate mai sus. Obținerea și evaluarea unui nou fluorocrom destinat examinării directe a specimenelor clinice, obținerea extractelor unispecie din cultură fungică totală destinate aprecierii reactivității cutanate în testele alergice la om și animale, observarea efectului hemolitic și de toxicitate acută a acestor extracte pe râmă - *Lumbricus Terrestris*, precum și demonstrarea existenței unui nou factor de patogenitate fungică fac parte din corolarul metodelor și tehnicilor de diagnostic micologic ce au servit îndeplinirii obiectivelor propuse. În **capitolul V** s-a urmărit realizarea a patru mari obiective; aprecierea cantitativă, calitativă alături de ponderea și distribuția genurilor/speciilor fungice identificate în spațiile studiate. Am izolat și identificat principalele genuri și specii fungice din spațiile de muncă și locuit, prin prelevarea probelor de la diverse distanțe față de sursele de ventilație ale unităților centrale ale calculatoarelor dar și a altor echipamente dotate cu sisteme asemănătoare.

Sunt prezentate aici tehnicile utilizate în vederea prelevării probelor precum și criteriile ce au stat la baza identificării fungice. Au fost prelevate prin aplicarea mai multor tehnici **433**

de probe. Am urmărit acoperirea unei palete cât mai largi privind destinația spațiilor respective dar alegerea participanților la studiu a avut la bază o serie de criterii, unele dintre acestea eliminatorii, precum; vârsta cât mai redusă, să fie clinic sănătoși, să utilizeze minim 6 ore zilnic calculatorul personal (PC) și să dețină un animal de companie. Au fost recoltate probe din nouă zone urbane plus toate spațiile Spitalului Clinic de Pneumologie. În spațiile unde au fost prezente animalele de companie, tehnica de prelevare a probelor a fost adaptată cerințelor studiului. În linii mari, prin tehnica sedimentării pasive au fost recoltate circa **179** de probe și realizate peste **1800** de frotiuri din culturi, 189 de probe au fost recoltate cu tamponul tip exudat de la nivelul grilajului de ventilație al calculatoarelor personale și al echipamentelor medicale, realizându-se peste **2000** de frotiuri din culturi. Au fost recoltate prin periere și tundere a 0,5 gr. de păr de pe suprafața corporală a animalelor circa **32** de probe și realizate **350** de frotiuri din culturi. Am recoltat **28** de fragmente inerte, în special fragmente de mobilier și pagini de carte pentru analiza cărora au fost realizate peste **100** de frotiuri din culturi. În perioada 20. 11. 2007 – 1. 06. 2008 am recoltat circa **153** de probe din toate spațiile Spitalului Clinic de Pneumologie - Iași, și numai pe acest segment, pentru identificarea fungică la nivel de gen și specie au fost realizate peste **800** de frotiuri din culturi. În general concentrația fungică de microclimat ar trebui să aibă corespondență cu cea exterioară privind componența genurilor identificate dar în realitate nu este deloc așa. Din cercetările efectuate reiese faptul că cele mai numeroase specii și genuri fungice au fost puse în evidență în spațiile închise, la nivelul grilajului de ventilare al calculatorului personal dar și la nivelul filtrelor aparatelor de aer condiționat sau a echipamentelor medicale, fiind identificați spori viabili, cultivabili, dintr-o gamă surprinzător de largă de genuri fungice. Pentru majoritatea eșantioanelor, identificarea s-a realizat la nivel de specie iar atunci când nu a fost posibil la nivel de gen. Valorile înregistrate în majoritatea spațiilor se încadrează în intervalul de **900 - 1700 UFC/m³** de aer, acestea fiind cu mult peste cele recomandate ca “limite de siguranță” și prezentate în partea generală. Nu am constatat o diferență privind încărcătura fungică între spațiile unde există animale de companie și celelalte și în câteva situații doar de la animalele de companie s-au identificat anumite specii fungice care nu au fost regăsite în aerul și pe suprafețele spațiilor respective. Prezența animalelor de companie contribuie astfel la diversificarea genurilor și a speciilor fungice rezidente. Nu pot fi realizate corelații de sezon deoarece în habitate acționează alți factori decât în mediul extern. Rezultatele obținute într-un spațiu relativ închis nu pot fi extrapolate altui spațiu, fiecare situație trebuie tratată în mod diferențiat în funcție de rezultatele investigațiilor și după aprecierea prin examene paraclinice a stării de sănătate a locuitorilor. Din punct de vedere procentual au predominat speciile aparținând genurilor *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*,

Alternaria, *Rhizopus* și *Chaetomium*. Din totalul speciilor aspergilare identificate o pondere mai mare au avut; *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*. *Cladosporium herbarum* este specia dominantă în multe din eșantioanele examinate fiind izolată atât de pe suprafețe cât și de la nivelul instalațiilor de aer condiționat. Sporii acestor fungi sunt cunoscuți ca fiind intens alergogeni, pot cauza leziuni epiteliale, cheratite, onicomicoze, sinuzite sau infecții ale căilor superioare aeriene. În probele prelevate de la Spitalul de Pneumoftiziologie o pondere foarte mare au avut-o genurile *Aspergillus* și *Penicillium* uneori fiind izolate chiar specii în cultură pură. La etajul cinci al Spitalului de Pneumoftiziologie s-au înregistrat cele mai mari valori ale UFC/m³ de aer, în intervalul **1467 – 1572**, acesta fiind una din cauzele contaminării etajelor inferioare. În saloanele Spitalului de Pneumoftiziologie am înregistrat valori foarte mari ale UFC/m³ de aer, de **1415** sau **1887**, ceea ce ar putea fi explicat prin accesul necontrolat al persoanelor străine – vizitatori, dar și prin existența unor echipamente medicale dotate cu sisteme de ventilație a căror parametri de funcționare nu sunt respectați (spălarea filtrelor fără a fi înlocuite la timp). La videoendoscopie - endoscopie intervențională valoarea UFC/m³ de aer era **1258**, la fibrobronhoscopie **681** UFC/m³ de aer precum și în perimetrul sălii de operații **733** UFC/m³ de aer. La videoendoscopie unde sunt prezente calculatoare dar și alte echipamente dotate cu sisteme de ventilație valorile UFC/m³ de aer înregistrate sunt nepermis de mari. Deși *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* și *Cladosporium* sunt genurile dominante în majoritatea spațiilor studiate, alte genuri ce nu fac parte din categoria celor ubicuitare chiar dacă au o pondere mai mică pot fi mult mai agresive, manifestând un grad mare de patogenitate și adaptare la cele mai diverse substraturi. De remarcat prezența în multe dintre spațiile analizate a genurilor *Hormonema*/teleomorf *Sydowia polyspora*, cu implicații în patologia pheohifomicozelor dermice și *Stachybotrys chartarum* agent etiologic al hemosiderozei pulmonare la copii. Peste 60% dintre speciile identificate, sunt cunoscute ca fiind alergogene și toxigene. În **capitolul VI** propunem o nouă metodă de diagnostic microbiologic ce are la bază determinarea capacității hemolitice a speciilor fungice izolate din spațiile de muncă și locuit precum și un test de toxicitate acută pe râmă - *Lumbricus terrestris*, efectuat cu extracte fungice totale obținute în laborator. Obiectivele principale pe acest segment al cercetării au fost; aprecierea capacității hemolitice și toxice a unora dintre speciile fungice identificate în spațiile examinate, obținerea extractelor unispecie din cultură fungică totală și nu în ultimul rând testarea, în premieră, a efectului hemolitic și toxic al extractelor pe râmă-*Lumbricus terrestris*. În acest capitol prezentăm tehnica de obținere a extractelor uni-specie din cultură fungică totală, extracte ce au servit ca alergeni în testarea cutanată la subiecții umani, realizându-se o comparație cu alergenii

din trusa de testare “Halcis Prick-Test”. Pentru prima dată în România este realizat un studiu de analiză și apreciere a capacității hemolitice a fungilor, utilizând în acest scop specii și genuri identificate în spațiile de muncă și locuit analizate, după cum urmează; *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Trichoderma viride*, *Alternaria chlamydospora*, *Stachybotrys chartarum*, *Acremonium spp.*, *Conidiobolus spp.*, *Chrysosporium spp.*, *Penicillium spp.*, *Penicillium commune*, *Aspergillus ochraceus*, *Scopulariopsis spp.*, *Penicillium italicum*, *Chaetomium spp.*, *Penicillium crustosum*, *Aspergillus spp.*, *Aspergillus versicolor*. Din toate cele trei temperaturi de termostatare la care am testat capacitatea fungilor de a produce hemoliză pe agar-sânge de berbec, cea mai eficientă s-a dovedit a fi cea de 27⁰C. La această temperatură de incubare 11 dintre speciile fungice testate au produs hemoliză completă în timp ce la 25⁰C nouă și la 37⁰C doar opt. Deci temperatura joacă un rol important în potențarea capacității hemolitice fungice. Rezultatele înregistrate după 14 zile de termostatare relevă faptul că 35% dintre speciile testate produc hemoliză completă iar 23% produc hemoliză incompletă, indiferent de temperatura utilizată. În mod diferențiat, în funcție de temperatura de termostatare, după 14 zile am observat că, 54% dintre speciile testate produc hemoliză completă, 39% hemoliză incompletă și 7% nu produc deloc hemoliză la anumite temperaturi. Reiese clar faptul că temperatura poate influența în mod indirect capacitatea hemolitică a fungilor printr-o restricționare în dezvoltarea coloniilor. Prin comparație cu hemoliza bacteriană cea fungică este mai lentă și poate fi observată cel mai devreme după trei zile de termostatare. Raportat la compoziția mediului de bază am observat că pe mediul P.D.A au prezentat hemoliză 10 dintre speciile testate, 9 pe mediul Merck și 8 pe mediul C.GA. Deci cea mai echilibrată compoziție este cea a mediului P.D.A. În privința vitezei de apariție a hemolizei fungice am putut observa că; *Stachybotrys chartarum* produce o clarificare a mediului dîrugînd eritrocitele după doar trei zile iar *Alternaria chlamydospora* după cinci zile de dezvoltare, ceea ce indică un pronunțat caracter de patogenitate etalat de cele două specii. Apariția hemolizei complete este lentă, la 5-14 zile, pentru speciile *Aspergillus versicolor*, *Scopulariopsis spp.*, *Penicillium italicum*, *Acremonium spp.* și *Aspergillus niger* fiind influențată atât de temperatură cât și de compoziția mediului dar este cel puțin la fel de importantă ca cea bacteriană, prin prisma efectelor pe termen lung pe care le poate avea asupra organismelor. Considerăm că hemoliza incompletă apare ca o consecință firească a eliberării produșilor de metabolism fungic în mediul de cultură.

Stachybotrys chartarum, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Rhizopus stolonifer*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria chlamydospora*, *Aspergillus ochraceus*, *Scopulariopsis spp.*, *Trichoderma viride* sunt speciile fungice a căror extracte, obținute în laborator, au fost selectate în vederea inoculării în regiunea nodului cardiac la *Lumbricus terrestris*. În urma

desfășurării experimentului am observat că extractele de *Rhizopus stolonifer*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria chlamydospora*, *Scopulariopsis spp.*, *Trichoderma viride*, nu au afectat râmele pe toată durata experimentului, în timp ce extractele de *Stachybotrys chartarum* și *Aspergillus ochraceus* au demonstrat cel mai rapid efect de toxicitate acută asupra râmelor.

Testarea pe râme-*Lumbricus terrestris* s-a dovedit a fi un model experimental reușit, acestea pot fi markeri, pentru evaluarea *in vivo* a toxicității extractelor fungice totale. **Capitolul VII** este destinat ca și precedentul dezvoltării unor noi tehnici de diagnostic micologic. În acest sens am obținut și evaluat un nou fluorocrom pentru detecția rapidă a elementelor fungice în specișenele clinice. Roșu de Congo poate fi utilizat ca fluorocrom nespecific pentru examinarea directă și detecția rapidă a elementelor fungice în specișenele clinice, în preparatele native sau parafinate. Reprezintă o alternativă mult mai ieftină în comparație cu „Calcofluor white” - fluorocromul cel mai utilizat în prezent. Roșu de Congo poate fi utilizat pe orice tip de prelevat clinic, inclusiv a celor deja pregătite prin tehnici histologice (parafinare), este de cel puțin zece ori mai ieftin decât „Calcofluor white”, este stabil, poate fi păstrat până la 8 luni la temperatura de refrigerare, poate fi utilizat la un pH cu valori între 5-7 și nu este afectat de lumină. Este un fluorocrom ușor de preparat cu un cost efectiv extrem de redus iar formalina și glutaraldehida ce intră în compoziția acestuia sunt cunoscute pentru efectul fungicid ceea ce reduce semnificativ riscul expunerii examinatorului în timpul manoperelor de lucru. Sunt prezentate șase studii de caz prin care ilustrăm și demonstrăm că examinarea prin fluoromarcare a probelor poate înlătura neajunsurile create de contaminarea bacteriană oferind o delimitare netă și o imagine clară a ceea ce înseamnă prezență fungică în toate tipurile de specișenele clinice analizate. În **capitolul VIII** intitulat “Sporirea gradului de predictibilitate pentru afecțiunile respiratorii umane cu etiologie fungică prin evaluarea a două tipuri de chestionare” s-au evaluat și interpretat rezultatele aplicării a două tipuri de chestionare la 30 de subiecți. Toți participanții la studiu au fost informați despre eventualele riscuri experimentale, fiindu-le puse la dispoziție toate datele necesare pentru luarea unei decizii perfect conștiente.

Atât chestionarele anamnetice cât și “Fișa de consimțământ informat” au fost consultate și semnate de către toți participanții la acest studiu. Subiecții au fost selectați pentru aceste ultime evaluări în baza următoarelor criterii; vârsta cuprinsă între 18-55 de ani, ambele sexe, fără afecțiuni respiratorii cu patru săptămâni înainte de începerea evaluărilor paraclinice; utilizatori ai calculatorului personal minim 6 ore zilnic; au fost preferați subiecții proprietari de câini sau/și pisici; sănătoși, fără probleme medicale serioase sau evidente, atât fumători cât și nefumători precum și subiecți diagnosticați anterior ca fiind alergici numai la praf, acarieni, polen sau produse alimentare. Starea de graviditate a femeilor a reprezentat motiv de excludere

din cadrul studiului. Chestionarele - anamnetic și tehnic, au fost completate de către 30 dintre participanții la acest studiu, cinsprezece dintre aceștia deținând și animale de companie.

Totodată cei 30 de participanți au parcurs toate etapele studiului și au răspuns cerințelor acestuia. Chestionarul anamnetic "I" cuprinde 49 de întrebări iar chestionarul tehnic "II" cuprinde 36 de întrebări din care au fost aplicate și interpretate treisprezece ca fiind relevante pentru interpretarea rezultatelor. Pentru ambele chestionare răspunsurile așteptate au fost de patru tipuri; "Da", „Nu”, „Nu știu” și „Observații”. Pentru înregistrarea factorilor fizici de microclimat am utilizat un instrument portabil de mare precizie Kestrel 3500, iar din totalul parametrilor disponibili, având în vedere că cercetările s-au desfășurat pe parcursul ultimilor 3 ani am luat în considerare pentru interpretarea rezultatelor doar temperatura, viteza vântului și umiditatea relativă din spațiile studiate în momentul determinării. Răspunsurile afirmative din cele două chestionare au fost însumate reprezentând punctajul acordat fiecăruia dintre participanții chestionați, ceea ce a reprezentat valoarea finală pe care am corelat-o atât cu rezultatele obținute în urma investigațiilor paraclinice precum și cu rezultatele obținute în urma monitorizării spațiilor studiate, respectiv relevarea principalelor genuri și specii fungice identificate alături de valorile UFC/m³ de aer obținute pentru fiecare dintre spațiile studiate.

Valoarea fiecărei întrebări este dată de exprimarea procentuală a răspunsurilor afirmative oferite de către indivizii chestionați. Raportat la ambele chestionare din totalul de 62 de întrebări utilizate, ponderea răspunsurilor afirmative a fost de peste 40%. Tot în această etapă a fost înregistrată capacitatea unităților de răcire ale calculatoarelor personale de orice tip și a altor echipamente, dotate cu sisteme de ventilație, de a crea turbulențe, prin măsurarea vitezelor de moment ale curenilor de aer de la o distanță de 10 și respectiv 20 cm față de acestea. Media valorilor înregistrate ale curenților de aer la 10/20 de cm distanță de unitatea de răcire a calculatorului personal este de circa 2/1,4 m/s pentru unitățile tip "desktop" și de 1,5/0,8 m/s pentru cele de tip „notebook”. Aceste valori, surprinzător de mari, crează și mențin o mișcare continuă a maselor de aer în special în "**zona personală de risc**" a utilizatorului de calculator personal. Problemele tipice cauzate de încărcarea electrostatică sunt atracția, aderența și stocarea prafului deci implicit și a sporilor și fragmentelor fungice. Toate acestea sunt urmate de aerodispersia constantă a particulelor fungice fiind menținută poluarea în spațiile respective la cote cel puțin îngrijorătoare pentru sănătatea umană dar și animală. Toate aceste afirmații sunt susținute de faptul că de la nivelul sistemelor de ventilație ale calculatoarelor s-au identificat cele mai multe specii și genuri fungice dintr-o gamă extrem de variată și marea majoritate a acestora nu ar trebui să se regăsească pe suprafețele și în aerul unui microclimat sănătos de muncă și locuit. Câteva dintre concluziile prezentate în acest capitol sunt; la 30%

dintre imobilele construite din plăci prefabricate de beton armat sau blocuri de beton au fost constatate condensul și igrasia, cărămida rămânând cel mai recomandat material de construcție; etanșeitatea bună oferită de ferestrele tip termopan împiedică o bună ventilare naturală a locuințelor și conduce la creșterea umidității astfel încât mucegaiul este aproape întotdeauna prezent mai ales în jurul ferestrelor. Pe parcursul **capitolului IX** realizăm o conexiune directă între gradul de afectare a stării de sănătate umane și animale și poluarea fungică a spațiilor de muncă și locuit. Procedurile experimentale s-au desfășurat sub strictă supraveghere medicală fiind aprobate de Comisia de etică din cadrul Spitalului de Pneumoftiziologie-Iași, în cadrul Departamentelor de Microbiologie – Imunologie și Clinică Medicală din cadrul Facultății de Medicină Veterinară-Iași, în cadrul Cabinetului de Alergologie afiliat Centrului Medical Copou-Iași, în Clinica și Laboratorul Spitalului de Pneumologie-Iași precum și cu participarea laboratorului Stani's Lab. Au fost respectate normele naționale și europene în privința standardelor de practică clinică – “Good clinical practice”. Metodologia a fost elaborată astfel încât procedurile utilizate să minimizeze eventualele riscuri și inconveniente potențiale în ceea ce privește participarea la acest studiu. Subiecții au fost evaluați prin; aprecierea funcției pulmonare-spirometrie, utilizarea unui impactor intranazal pentru recoltarea probelor de aer, interpretarea valorilor înregistrate după aplicarea celor două chestionare, testarea cutanată a alergenilor fungici unispecie obținuți “in house” prin comparație cu cei din trusa de testare “Halcis Prick-Test” și aprecierea statusului imunitar prin două metode diferite, un test imunocromatografic, de tip “sandwich”, cu exprimare calitativă și semicantitativă, pentru detecția rapidă a IgE totale, rezultatele fiind obținute în cinci minute și prin realizarea imunogramelor (IgE, IgA, IgM, IgG) prin chemiluminescență într-un laborator de specialitate.

Rezultatele prezentate în acest capitol au la bază interpretarea a opt tipuri de teste după cum urmează ;

1. Identificarea principalelor genuri și specii fungice în spațiile studiate prin recoltări de la nivelul sistemului de răcire al calculatorului personal, de pe filtrele aparatelor de aer condiționat sau a echipamentelor medicale și din imediata apropiere a acestora.
2. Date privind încăcătura și compoziția fungică în spațiile studiate obținute prin metoda sedimentării pasive.
3. Principalele genuri și specii fungice identificate prin culturi, după utilizarea RIN (recoltatorului intranazal) și aprecierea UFC inhalate într-o oră raportate la 60% din debitul ventilator de repaos (D.V.R.), timp de 6 ore, respectiv 1,62 m³ la femei și 1,94 m³ la bărbați.
4. FEV1/ FVC : unde FEV1 (volumul expirator maxim într-o secundă) este exprimat ca procent din FVC (capacitatea vitală forțată), oferă informații clinice privind gradul de limitare a

fluxului de aer. Valorile FEV1 sunt exprimate ca procentaj din FVC. Raportul FEV1/FVC este cuprins între 70% și 80% la adultul normal; valori sub 70% indica limitarea fluxului de aer. Este influențat de vârstă, sex, înălțime, etnie. La nici unul dintre subiecții examinați nu au fost înregistrate devieri de la valorile normale.

5. Rezultatele testului rapid IgE – cu înregistrarea doar a valorilor peste limita admisă de 80 UI/ml ser sau plasmă.
6. Analiza imunogramelor efectuate prin chemiluminescență și evidențierea valorilor - IgE, IgG, IgA, IgM - deviate de la valorile de referință, pentru fiecare tip de imunoglobulină.
7. Testarea cutanată a alergenilor fungici unispecie obținuți “in house” prin comparație cu cei din trusa de testare “Halcis Prick-Test”.
8. Corelarea răspunsurilor afirmative oferite de către participanții chestionați cu rezultatele investigațiilor paraclinice.

La testarea cutanată, cu extractul de *Aspergillus niger* au reacționat prin apariția unei indurații de 3-5 mm cu eritem evident, 15 dintre subiecții testați iar 6 dintre aceștia au prezentat o indurație >5 mm cu eritem persistent. La testarea extractului de *Cladosporium herbarum* obținut în cadrul laboratorului nostru, la 16 indivizi am constatat o indurații de 3-5 mm cu eritem evident și la 3 dintre aceștia o indurație >5 mm cu eritem persistent rezultatele privind reactivitatea fiind în deplină concordanță cu cele obținute prin utilizarea extractelor din trusa “Halcis Prick-Test”. La extractul de *Alternaria clamidospora*, la 13 subiecți am constatat o indurație de 3-5 mm cu eritem evident și la 3 dintre aceștia o indurație >5 mm cu eritem persistent în timp ce la aplicarea extractului de *Alternaria alternata* din trusa “Halcis Prick-Test” reactivitatea a fost mai redusă – 9 indivizi au prezentat o indurație de 3-5 mm cu eritem evident. Și în cazul extractelor de *Aspergillus versicolor* și *Stachybotrys chartarum* am constatat indurații de 3-5 mm cu eritem evident la subiecții testați. Au existat patru situații când testarea a fost întreruptă deoarece indivizii testați au avut reacții exagerate manifestate mai întâi prin prurit localizat și apoi generalizat, senzații de sufocare, dureri de cap, amețeală și uscarea cavității bucale cu senzație de apăsare în piept. Valorile UFC/m³ de aer obținute prin metoda sedimentării pasive, în spațiile de muncă și locuit, ale indivizilor ce nu au prezentat valori peste limitele normale ale imunoglobulinelor s-au încadrat în intervalul **681 – 1415** în timp ce valorile UFC/m³ de aer în „**zona personală de risc**” din spațiile de proveniență ale indivizilor la care valorile imunoglobulinelor au fost peste cele de referință, s-au încadrat în intervalul **629 – 1939**. Prin comparație, numărul particulelor fungice viabile inhalate (UFC), după aplicarea factorului de corecție a fost în intervalul **168 – 277**, pentru indivizii cu valori normale ale imunoglobulinelor și în intervalul **184 – 487** la subiecții ce au prezentat valori peste limitele de

referință ale imunoglobulinelor. Extractele de *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium spp.* și *Alternaria alternata*, ocupă poziții de frunte în ceea ce privește gradul de corelare a reactivității cutanate cu poluarea fungică a habitatelor studiate, fiind urmate îndeaproape de *Scopulariopsis spp.*, *Stachybotrys chartarum* și *Rhizopus spp.* Doar în două cazuri - subiecții **5 și 24**, am observat reactivitate cutanată la o singură specie fungică din cele identificate în spațiile analizate. Subiecții **1, 3, 6, 7, 11, 13, 14, 16, 17, 23, 25**, au reacționat dermic prin indurații de 3-5 mm cu eritem evident și de 5 mm cu eritem persistent, la două dintre extractele fungice obținute din speciile și genurile izolate din spațiile în care aceștia își desfășoară activitatea. S-a apreciat gradul de risc al subiecților analizați, de a dezvolta o afecțiune respiratorie alergică sau non-alergică cu etiologie fungică în următorii ani, luând în considerare punctajul obținut la chestionarele anamnetice, numărul particulelor fungice viabile inhalate și numărul total al speciilor fungice la care aceștia au reacționat dermic prin indurații de 3-5 mm cu eritem evident sau de 5 mm cu eritem persistent precum și valorile crescute ale imunoglobulinelor. S-a aplicat următorul raționament; la numărul particulelor fungice viabile inhalate, la valorile obținute de către subiecți la chestionarele I și II și la numărul total al speciilor fungice la care fiecare dintre subiecți a reacționat dermic prin indurații de 3-5 mm cu eritem evident sau de 5 mm cu eritem persistent, s-au adăugat 10 puncte dacă valoarea UFC/m³ de aer a fost de peste 1000, și încă 10 puncte în cazul în care subiecții analizați au prezentat valori ale imunoglobulinelor peste limitele normale. În **24** din cele **30** de spații analizate, valoarea de **1000 UFC/m³** de aer a fost depășită. Fiecare dintre subiecții analizați a obținut un punctaj ce a permis încadrarea acestora în trei grupe de risc, notate astfel; GR I, GR II, GR III, unde GR I este grupa asimilată unui risc major de a dezvolta o afecțiune respiratorie alergică sau non-alergică cu etiologie fungică în următorii ani și GIII unui risc minor, dacă se mențin aceleași coordonate privind poluarea fungică, particularitățile habituale și condițiile de microclimat existente în timpul desfășurării prezentului studiu. Încadrarea subiecților în aceste grupe de risc s-a realizat în baza punctajului obținut după însumarea tuturor valorilor conferite fiecărei etape de examinare astfel; GR III între 200 - 350 puncte, GR II 350 - 450 puncte și GRI 450 - 600 puncte. În urma analizei rezultatelor în GR I s-au încadrat **13** indivizi, toți prezentând valori ale Ig peste cele de referință, în GR II **8** indivizi, din care 7 cu valori ale IgE, IgG peste limitele de referință și în GR III **9** indivizi din care doar 3 au prezentat valori ale IgE peste limita de referință de 80UI/ml. Numărul de particule fungice viabile, inhalate prin utilizarea impactorului intranazal, în “**zona personală de risc**” a utilizatorului de calculator personal a fost mult diferit față de valorile înregistrate de către aceeași subiecți într-o cameră lipsită de orice echipament dotat cu sistem de ventilație. Șase dintre subiecții examinați au constituit lotul

martor iar valorile înregistrate au fost următoarele; **subiectul 13**, 302 UFC inhalate în “zona personală de risc”/martor 134 UFC inhalate, **subiectul 14**, 352 UFC inhalate în “zona personală de risc”/Martor 92 UFC inhalate, **subiectul 15**, 369 UFC inhalate în “zona personală de risc”/Martor 142 UFC inhalate, **subiectul 16**, 277 UFC inhalate în “zona personală de risc”/Martor 159 UFC inhalate, **subiectul 17**, 394 UFC inhalate în “zona personală de risc”/Martor 151 UFC inhalate, **subiectul 27**, 487 UFC inhalate în “zona personală de risc”/Martor 109 UFC inhalate. Este evidentă existența “zonei personale de risc” a utilizatorului de calculator personal. În toate cele 30 de cazuri după testarea cutanată s-a constatat că cel puțin una dintre speciile fungice la care subiecții au reacționat dermic prin indurații de 3-5 mm cu eritem evident sau 5mm cu eritem persistent a putut fi identificată atât la nivelul grilajelor de ventilație ale calculatoarelor personale, de pe filtrele altor echipamente cât și din probele de aer obținute prin sedimentare pasivă și prin utilizarea impactoarelor intranazale. Toate rezultatele obținute în urma cercetărilor demonstrează clar conexiunea dintre poluarea fungică a spațiilor, inhalarea sporilor, a fragmentelor miceliene și riscurile asupra sănătății umane, fiind relevată astfel susceptibilitatea indivizilor analizați de a dezvolta o afecțiune respiratorie alergică sau non-alergică cu etiologie fungică în următorii ani. În **capitolul X** “Concluzii finale și recomandări”, sunt prezentate succint principalele rezultate ale cercetărilor din care s-au desprins o serie de recomandări privind conduita corectă și modalitățile de monitorizare a gradului de poluare fungică din spațiile închise. Este esențial ca atât sursele cât și căile de expunere să fie determinate corect. Cum dezideratele majore ale cercetărilor au fost centrate pe îmbunătățirea calității vieții oamenilor și animalelor fiind direcționate totodată și spre dezvoltarea unor noi tehnici/metode de diagnostic micologic, un demers firesc va fi cel de a prezenta rezultatele acestor cercetări autorităților competente pentru demararea unor inițiative legislative privind stabilirea unor limite de poluare fungică în spațiile de muncă și locuit și de adoptare a unei conduite de diagnostic noi și eficiente destinate prevenirii afecțiunilor segmentului respirator.

ABSTRACT

Early detection of respiratory diseases in humans and animal segment, determining the prevalence of unknown risk factors or neglected ones until recently and the establishment of a community health professional or a target group were based on determining the existence of unexplored associations till now. Individual testing is first time showing the influence of fungal pollution in working and living spaces, adding for the investigations results a predictive value for respiratory allergic and non-allergic diseases at humans and animals. Although allergic sensitization is not a disease itself, it's causes deserve to be analyzed and decoded because of its association with asthma and other diseases, many of them quite serious. Unique environmental microclimate conditions from the indoor spaces makes it possible for fungal development, their predominance in the inner atmosphere can be attributed to their capability to grow in almost any conditions. Among fungal micro-habitate from a living space are: waste storage containers, food storage areas (including freezer), vinyl wallpaper, decorative plants, books (anything containing cellulose), windows and close to them, bathroom, air-conditioning and office equipments, etc.. Observations valid for a microclimate can not be automatically extrapolated to the other microclimate, due to existence of large variations among the factors that contributes to the stimulation or maintenance of indoor fungal development. Fungal diversity in work or living spaces has been much less studied than that outside due to the existence of technical impediments. In part, we talk about the difficulties in choosing the location to study and free access to them especially when it comes to private homes or offices of the commercial companies. Health diagnosing and accounting issues that may arise consecutive indoor fungal exposure may be of great use in assessing the cause-effect relationship. Non-allergic effects of fungi on humans and animals are very difficult to prove by direct evidence that's why any clue has been detected was excessively explored. Central units of computers are equipped with a ventilation system for cooling components. Ventilation, even at low levels, contributes to the removal of moisture from a space. Inside equipment fitted with ventilation systems can be a "database" that includes the most relevant information about "resident fungi", in a given area at a time. Because fungal adhesion mechanisms (matrix

glycoprotein) in computer components (motherboard, cooler-fan, etc.) particle crossing through the ventilation system due to electrical loading of metal or celluloid surfaces is being facilitated their static sedimentation as accession followed by overheating computers, leading to lower relative humidity especially in the "personal risk area" of users with negative health impact.

Electrostatic charging is a physical process by which the solids (eg carcasses and parts of electrical appliances) appear charge, due to mechanical actions such as air friction, vibration, proximity of metal wires crossed by electrical currents, etc. Typical problems caused by static charging are the attraction, adhesion and storage of dust so by default are the fungal spores and fragments. All this will be followed by constant air dispersion of fungal particulate and so pollution is kept at levels that are at least warring for human and animal health. We intend to demonstrate the existence of "personal areas of risk" for personal computer users and that the central computer unit can be considered a "database" that can accumulates and shows the diversity of fungal species and genera existing at a time in each area considered in the experimental conditions imposed. Major goal of research was to find a direct connection between the degree of impairment of health and fungal pollution in the studied spaces, between the viable airborne fungal elements and inhaled ones, per unit of time by assessing the quantity, quality and distribution of fungal species identified. Also we will recommend values for "safe" limit's concerning fungal pollution in work and living spaces. We wish that through this research of the clinically healthy individuals, young and with immunological competence and by a comprehensive multiphase screening, to "fill a gap" for understanding of the beginning and evolution of allergic and non-allergic respiratory diseases. The thesis consists of two distinct parts. "The current state of knowledge" first part is drawn over 3 chapters comprising 52 pages. In the **first chapter** are briefly presented a number of concepts on the fungal biology, morphology and physiology with a short classification, being reviewed the main features that are relevant for the aerobiological research conducted. **Chapter II** presented a number of elements of both clinical significance and factors that may influence the presence of certain fungal species and genera in work or living spaces, focusing on ecological factors on inter-conditionality between microclimate and fungal dynamics. Are presented mechanisms underlying air dispersion and germination of fungal spores and fragments in indoor environments. In the second part of this chapter are shown a series of statistics, epidemiology of allergic and respiratory disorders and distribution of some fungal species in both hospital and in working and living spaces and are also presented difficulties faced by clinicians in diagnosing fungal infections. Also still in this chapter are presented in the light of scientific latest concepts and assumptions in aeromicrobiology, studies designed to facilitate understanding of the occurrence

of allergies in relation to fungal environmental biology and activities conducted in work and living spaces. Are presented in **chapter three** fungal pathogenic mechanisms known to date and a number of particularities for allergic respiratory disease that develops both in humans and animals. **Part 2** of "own research" is written over 6 chapters covering 173 pages. In **Chapter IV**, entitled "The aim and research objectives" are presented in detail the main directions. Assessment of quantity, quality and fungal genera and species distribution in work and living spaces, proving the existence of "personal risk zone " for personal computer users and that the central computer unit can be considered a "**database**" which accumulates and shows the diversity of fungal species and genera present at one point in space are just some of the proposed objectives. Using for the first time in Romania an intranasal air sampler, evaluation of two new types of questionnaires and assessing the health status of participants in this study, humans and animals, using serology and skin tests were the means by which we have proposed to complete the objectives set out above. Evaluation of a new fluorochrome for direct examination of clinical specimens, obtaining fungal culture extracts for assessing skin reactivity in allergy tests in humans and animals, observing the hemolytic and acute toxicity effect of these extracts on the earthworm - *Lumbricus Terestris* and demonstrate the existence of a new fungal pathogenicity factor are part of the mycological corollary diagnostic methods and techniques that have served to achieve all these objectives. In **Chapter V** it was intended to achieve four main objectives, assessment of quantity, quality and distribution of fungal genera and species identified. Were monitored all sources of ventilation and identified the fungal genera and species being presented the sampling techniques used for each urban area and for all examined spaces. We isolated and identified major fungal genera and species of work and living spaces, by taking samples at different distances from the source of ventilation units of computing power but also from other equipment with similar corporate. They are presented here techniques used for sampling and basics criteria for fungal identification. Were taken 433 samples by applying several techniques. We sought to cover many destination buildings but the choice of participants in the study was based on a number of criteria, such as the smallest age, clinically healthy, using the personal computer minimum of 6 hours daily and having a pet.

Samples were collected from nine urban areas and spaces of Pneumology Hospital, using sampling techniques adequate to the nature of surfaces and analyzed substrates. In areas where pets were present, sampling technique was tailored for the study. By gravitational sedimentation technique for fungal identification at genus and species were collected about 179 samples and examined over 1800 slides from cultures. 189 samples were collected with swab sampler from the ventilation grid of personal computers being examined over 2000 slides from

cultures. Were collected around 32 samples by brushing and clipping 0.5 g. of hair of the animal's body surface and we examined over 350 slides from cultures . We collected 28 bulk fragments, in particular pieces of furniture and pages of books and we examined more than 100 slides from fungal cultures. Between 20. 11. 2007 - 1. 06. 2008 we collected about 153 samples from all spaces of Pneumology Hospital - Iasi, and only on this segment to identify fungal colonies at genus and species level we examined more than 800 slides from cultures. In general microclimate fungal concentration should have correspondence with the exterior one concerning the composition of genera identified but in reality it is not so. The investigations conducted show that the most numerous species and genera were found in indoor spaces at ventilation grid at the source of the personal computer but also on filters of the air conditioning and medical equipment, here being identified viable spores, cultivable, from a surprisingly wide range of fungal genera. Most fungal species isolated can harm employees causing allergic respiratory diseases or skin diseases. For most samples, identification to species level was done and when it was not possible at gender. We found that in most cases values registered fall within the range of 900 - 1700 CFU/m³ air, most values were well above those recommended as "safety limits". We didn,t found a difference value between spaces where there are pets and others and in some cases only from the pet were identified some fungal species that were not found in the air and on the surfaces of living space, thus the presence of pets contribute to the diversification of resident fungal genera and species. Seasonal correlations can not be achieved because in the indoor spaces are acting different factors, other than in the external environment.

The results obtained in a relatively closed space can not be extrapolated to another one, each situation must be treated differently depending on the results of investigations and laboratory tests after the assessment of the individual's health. In terms of percentage prevalence fungal species belonging to the genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Rhizopus* and *Chaetomium*. Of the total aspergillus species isolated more predominance had *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*. *Cladosporium herbarum* is the predominant specie in many of the samples examined was isolated from both surface and from the air-conditioning. Spores of these fungi are known to be highly allergenic, may cause epithelial, keratitis, onychomycosis, sinusitis or upper air tract infection. In samples taken from the Hospital a very high proportion had the genera *Aspergillus* and *Penicillium* sometimes even isolated in pure culture. On the fifth floor of the Hospital we observed the highest count of CFU/m³ of air with values in the range from 1467 to 1572, this being one of the causes for contamination of the lower floors. In the Pneumology Hospital wards we counted a very high CFU/m³ of air, which could be explained by uncontrolled access

of foreign people - visitors, but also by the existence of medical equipment equipped with ventilation systems and operating parameters which are not respected. In video-endoscopy - intervention endoscopy CFU/m³ amount of air is 1258, at the fibrobronchoscopy 681 CFU/m³ air and in the perimeter of the preoperative room at 733 CFU/m³ air. At video-endoscopy where computers and other equipment with corporate air ventilation are present the values recorded of CFU/m³ of air are very high. Although *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria* and *Cladosporium* are the dominant types in most areas studied, other genres which are not ubiquitous even in a lower concentration may be more aggressive, showing a high degree of pathogenicity and adaptation to the various substrates. Note the presence in many spaces of gender *Hormonema*/teleomorf *Sydow polyspora*, with implications for pathology etiologic agent of skin disorders and *Stachybotrys*, etiologic agent of pulmonary hemosiderosis at children. Over 60% of the identified species are known to be allergenic and with high levels of toxicity which entitles us to say that assumptions of future installation of serious respiratory illnesses are justified. In **Chapter VI**, we propose a new method of microbiological diagnosis that is based on the determination of hemolytic ability of fungal species isolated from work and living spaces and on the results obtained from the acute toxicity test with total fungal extracts obtained in our laboratory, on the earthworm - *Lumbricus terrestris*. The main objectives were, observing the toxic and hemolytic ability of fungal species identified, obtaining extracts from fungal culture and not least testing for the first time the effect of hemolytic and toxic fungal extracts on the earthworm-*Lumbricus terrestris*. In this chapter we present the technique used to obtain extracts from a single species of the total fungal culture, which served for compared skin test with allergen from kits "Halcis Prick-Test". For the first time in Romania is a study of analysis and assessment of hemolytic ability of fungi, using for this purpose species and genera isolated from occupied work and living spaces as follows, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Trichoderma viride*, *Alternaria chlamydospora*, *Stachybotrys chartarum*, *Acremonium spp*, *Conidiobolus spp* *Chrysosporium spp*, *Penicillium spp*, *Penicillium commune*, *Aspergillus ochraceus*, *Scopulariopsis spp*, *Penicillium italicum*, *Chaetomium spp* *Penicillium crustosum*, *Aspergillus spp*, *Aspergillus versicolor*. For all three incubation temperatures that we tested to observe the ability of fungi to produce haemolysis on agar-sheep blood, the most effective proved to be the 27°C. At this incubation temperature 11 fungal species tested produced complete haemolysis while at the 25°C were nine and at 37°C only eight. So temperature plays an important role in potentiality of hemolytic fungal ability. Results recorded after 14 days on control reveals that 35% of the species tested produce complete haemolysis and 23% produced incomplete haemolysis, regardless of temperature we used. Differently, depending on control

temperature, after 14 days we observed that 54% of the species tested are producing complete haemolysis, 39% incomplete haemolysis and 7% shows no haemolytic activity only at certain temperatures. It is clear that temperature may indirectly influence the haemolytic ability of fungi by restricting their development. By comparison with the bacterial hemolysis fungal hemolysis is slower and can be observed as early as three days on control. Reported to the composition of the basic medium we observed that on PDA medium, 10 species tested showed haemolysis, 9 on Merck medium and 8 on C.G.A. medium. So PDA medium showed the best base composition. In terms of speed for occurrence of fungal haemolysis can see that, *Stachybotrys chartarum* produces an medium clarification consuming erythrocytes after only three days and *Alternaria chlamydospora* after five days of development of colonies which indicates a highly level of pathogenicity of the two species. Complete fungal haemolysis is slow, can be observed at 5-14 days, for *Aspergillus versicolor*, *Scopulariopsis spp*, *Penicillium italicum*, *Acremonium spp* and *Aspergillus niger* species and is influenced by both incubation temperature and medium composition but is very important in terms of long term effects on the living organisms. We believe that incomplete hemolysis occurs as a consequence of the released products of metabolism from fungi in culture medium. *Stachybotrys chartarum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Rhizopus stolonifer*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria chlamydospora*, *Aspergillus ochraceus*, *Scopulariopsis spp*, *Trichoderma viride* are fungal species whose extracts were obtained in the laboratory, and were selected for inoculation in the heart node region in *Lumbricus terrestris*. In the course of the experiment we observed that the extracts of *Rhizopus stolonifer*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria chlamydospora*, *Scopulariopsis spp*, *Trichoderma viride*, did not affect the earthworms all duration of the experiment, while extracts of *Stachybotrys chartarum* and *Aspergillus ochraceus* showed the most rapid effect of acute toxicity on earthworms. *Lumbricus terrestris* earthworm-testing has proved a successful experimental model, earthworms may be markers for assessing the *in vivo* toxicity of total fungal extracts. **Chapter VII** is intended as the previous for the development of new mycological diagnosis technique. We obtained and evaluated a new fluorochrome for the rapid detection of fungal elements in clinical specimens. Congo red can be used as a nonspecific fluorochrome for direct examination and early detection of fungal elements in clinical specimens in native preparations or paraffin embedded ones. Is a much cheaper alternative compared to "Calcofluor white" - the fluorochrome in use worldwide. Congo red can be used on any type of clinical specimens including those already prepared by histological techniques (parafinare), is at least ten times cheaper than "Calcofluor white, is stable, can be stored up to 8 months at refrigeration temperature, can be used with a pH value between 5-7

and is not affected by light. This fluorochrome is easily prepared with a cost effective extremely low and formalin and glutaraldehyde, included in the composition are known as fungicide those significantly reducing the risks of examiner exposure during the work. Are presented six case studies in humans and animals that illustrate and demonstrate that by fluorochrome examination we can not be disturbed by bacterial contamination being created a clear demarcation and a clear picture of what fungal presence in clinical specimens represents. In **Chapter VIII**, entitled "Increasing predictability for human respiratory diseases with fungal etiology by evaluating the two types of questionnaires" were evaluated and interpreted results for the 30 subjects that answered at the questions posed in the two types of questionnaires. All survey participants were informed about the risks posed by this experiment being made available to all data necessary for a decision well aware. Both questionnaires and "informed consent" were consulted and signed by all participants in this study. Subjects were selected for this final assessment in the following criteria, aged 18-55 years, and both sexes, without respiratory disease four weeks before the laboratory assessments or during their deployment; personal computer users at least 6 hours daily, have been favorite subjects holding pet owners of dogs or/and cats, healthy, no serious medical problems or obvious, both smokers and non-smoking and previously diagnosed as being allergic subjects only to, dust mites, pollen or food. Pregnancy status of women was the reason for their exclusion from the study. Questionnaires - for appreciate the health status and the technica onel, were completed by 30 of the participants in this study, fifteen of them holding pets. Also the 30 human participants have gone through all stages of the study and answered it,s requests. Questionnaire "I" contains 49 questions and the technical questionnaire "II" includes 36 questions and only thirteen of that have been applied for their statistical value, being relevant for interpretation of the results. Expected responses for both surveys were four types, "Yes", "No", "Do not know" and "Comments". For recording physical microclimate factors we used a portable precision instrument Kestrel 3500, and of all available parameters, given considering that research has been conducted over the past 3 years we considered for the interpretation of the results only temperature, wind speed and relative humidity in the spaces studied during the time determination. Positive responses from the two surveys are expressed as a percentage and the values obtained represent the score awarded to each of the participants interviewed. Sum values from the two questionnaires for each of the participants, will be the final amount that will be correlated both with the results of laboratory investigations and the results obtained by revealing the fungal genera and species isolated and with concentration values obtained from CFU/m³ of air in all spaces. The value of each question is given by expressing the percentage of positive responses given by the individuals interviewed. Reported in both questionnaires of the

total of 62 questions used for the 30 subjects share of positive responses was over 40%. Was registered the unit cooling fan capacity of personal computers and any other equipment, equipped with ventilation systems to create turbulence, by measuring velocities of the air from a distance of 10 and 20 cm from them. Average of values at 10/20 cm distance of the personal computer cooling unit is about 2/1,4 m/s for desktop units and 1.5/0.8 m/s for the notebooks.

These values, surprisingly high, create and maintain a continuous movement of air masses especially in the "personal risk zone" of personal computer user. Electrostatic charging is a physical process by which the solids (eg carcasses and parts of electrical appliances) appear charge, due to mechanical actions such as air friction, vibration, proximity of metal wires crossed by electrical currents, etc. Typical problems caused by static charging are the attraction, adhesion and storage of dust so default and fungal spores and fragments. These are followed by constant air dispersion of fungal particulate so pollution is kept at threat levels for human and animal health. All these allegations are supported by the fact that at the ventilation systems of the computers were identified most fungal species and genera of an extremely wide range and most of them should not be recovered from indoor spaces, from the air of a healthy working and living microclimate. Some of the findings presented in this chapter are; in 30% of buildings constructed of prefabricated reinforced concrete slabs and concrete blocks were found condensation and damp, brick remains the recommended construction material, the tightness of the windows prevent a good natural ventilation of housing and increase the humidity so that the mold is always especially around windows. During **Chapter IX** we are trying to make a direct connection between the degree of fungal pollution in work and living spaces and the harm that can be produce to human and animal health. Experimental procedures were conducted under strict medical supervision and approved by the Ethics Committee of the Pneumology Hospital, in the Departments of Microbiology - Immunology of the Faculty of Veterinary Medicine Iassy, in the Allergy Center Affiliate at Central Medical offices from Copou-Iassy, in the Clinic and Laboratory of Pneumology Hospital-Iassy and involving laboratory Stan's Lab. Have been met national and European rules on standards of clinical practice - "Good Clinical Practice. The methodology was developed so that the procedures used to minimize possible risks and potential disadvantages in terms of participation in this study. Subjects were evaluated by; assessing lung function-spirometry, use of impact intranasal air samples, the sum of values after application of the two questionnaires, unispecie fungal skin test allergens produced in-house compared with those from test kit "Halcis Prick-Test" and assessing the immune status by two different methods, a test chromatographic, with qualitative and semi-quantitative expression, for rapid detection of total IgE with results obtained in five minutes and making immunogramme

(IgE, IgA, IgM, IgG) by chemiluminescence method with an automatic analyzer. The results presented are based on the interpretation of the eight types of tests as follows;

1. Identifying key fungal genera and species in areas studied by sampling from the cooling fan system of the personal computer and its surroundings.
2. Data on fungal composition and charge obtained by sedimentation method.
3. The main fungal genera and species identified by culture, by use of RIN (intranasal sampler) and assessment of CFU inhaled in one hour reported for 60% of respiratory flow at rest (DVR) for 1.62 m³ for women and 1.94 m³ for men. during 6 hours of the experiment.
4. FEV1/FVC: where FEV1 (maximum expiratory volume in one second) is expressed as a percentage of FVC (forced vital capacity), provides clinical information on the degree of airflow limitation. FEV1 values are expressed as percentage of FVC. FEV1/FVC ratio is between 70% and 80% in normal adults, values below 70% indicates airflow limitation. Is influenced by age, sex, height, ethnicity. At the subjects examined were not recorded deviations from normal values.
5. IgE rapid test results - beyond permissible levels of 80 IU/ml serum or plasma.
6. Immunogram analysis performed by chemiluminescence and highlighting values - IgE, IgG, IgA, IgM - deviated from acceptable limits.
7. Fungal skin test with allergens produced in-house compared with those of test kit "Halcis Prick-Test".
8. Correlation between positive responses given by those asked for all questions with the results of laboratory investigations.

At the skin test with extract of *Aspergillus niger* 15 test subjects reacted by the appearance of an endurance well about 3-5 mm with erythema and 6 of them had an endurance > 5 mm with persistent erythema. In testing of *Cladosporium herbarum* extract obtained in our laboratory, 16 individuals have showed a 3-5 mm well with erythema and 3 of them an induration > 5 mm with persistent erythema the results being fully consistent with those obtained by using the extracts from the kit "Halcis Prick-Test". The extract of *Alternaria clamidospora* on 13 subjects found an induration of 3-5 mm with erythema and 3 of them showed an induration > 5 mm with persistent erythema while the application of *Alternaria alternata* extract kits "Halcis Prick-Test" reactivity was less - 9 individuals had an induration of 3-5 mm with erythema. The extracts of *Aspergillus versicolor* and *Stachybotrys chartarum* produced a well of 3-5 mm with erythema at tested subjects. There were four cases where testing was stopped because the individuals tested were overreactions first manifested by localized irritations and then generalized, feeling of suffocation, headache, dizziness and dry

mouth with tightness in the chest. Air CFU/m³ values obtained by passive sedimentation method, in work and living spaces, where the individuals had not above the normal values of immunoglobulins were within the range from 681 to 1415 while the values of air CFU/m³ in "personal risk zone" of origin spaces while individuals with immunoglobulin values exceeded the normal range, were within the range from 629 to 1939. By comparison, the number of viable fungal particles inhaled (CFU), after applying the correction factor was within the range from 168 to 277, for individuals with normal levels of immunoglobulins and the range from 184 to 487 subjects who presented values above the normal range of immunoglobulins. Extracts of *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium spp.* and *Alternaria alternata*, are in leading positions in the degree of correlation of skin reactivity to fungal pollution in studied spaces, followed closely by *Scopulariopsis spp.* *Rhizopus sp.p* and *Stachybotrys chartarum*.

Only in two cases - Subjects 5 and 24, we observed skin reactivity to one of the fungal species identified in the areas examined. Subjects 1, 3, 6, 7, 11, 13, 14, 16, 17, 23, 25, responded by skin endurances of 3-5 mm with erythema and 5 mm with persistent erythema at least at two of the fungal extracts obtained from fungal species isolated from their living and working spaces. Was appreciated the degree of risk of subjects analyzed, to develop an allergic respiratory disease or non-allergic fungal disease in the coming years, taking into account the score obtained from questionnaires, the number of viable fungal particles inhaled, the total number of fungal species in which they reacted at skin tests by at least 3-5 mm endurance with erythema and elevated immunoglobulin values. The following reasoning was applied, the number of viable fungal particles inhaled, the values obtained by the subjects to the questionnaires I and II and the total number of fungal species in which each of the subjects responded by skin endurances of 3-5 mm with erythema, adding 10 points for the CFU/m³ if value was over 1000, and another 10 points when the subjects analyzed had values above the normal limits of immunoglobulins. In 24 of the 30 areas examined, the 1000 CFU/m³ air has been exceeded. Each of the subjects received a score allowed their classification into three risk groups, as noted, RG I, RG II, RG III, where RG I is treated as a major risk group to develop an allergic or non - allergic respiratory disease with fungal etiology in the coming years and RG III a minor risk, if it maintained the same coordinates on fungal pollution, habitual features and microclimate conditions existing during the present study. Engagement in these risk groups was done under the score obtained by subjects after adding all the values above, RG III between 200 - 350, RG II, 350 to 450 and RG I 450 to 600 points. Following analysis the RG I have employed 13 individuals, all showing values above the reference of Ig in RG II, 8 of which 7 subjects showing the values of IgE, IgG above reference limits and in RG III, 9 of which 3

subjects shows values above the reference IgE 80UI/ml. It was established a control group composed of six participants. Values on the number of viable fungal particles inhaled by using intranasal impaction, in the "personal risk zone" of personal computer user defined as the space of about 3m³ where he acts were much different from the values recorded by the same subjects in a room without computers or any other device equipped with a ventilation system that can create turbulence of the air masses. Six of the subjects examined were subjected to this kind of determination as follows; Subject 13, 302 CFU in the "personal risk"/control 134 CFU, Subject 14, 352 CFU in the "personal risk"/ control 92 CFU, Subject 15, 369 CFU in the "personal risk" /control 142 CFU, Subject 16, 277 CFU in the "personal risk"/control 159 CFU, Subject 17, 394 CFU in the "personal risk"/control 151 CFU, Subject 27, 487 CFU in the "personal risk"/control 109 CFU. Clearly we prove the existence of "personal zone of risk" for personal computer user. In all 30 cases after skin testing, was found that at least one fungal species in which subjects responded by skin reactions, could be identified both at the ventilation sistem of personal computers or other equipment and from the filters of intranasal air samples and from samples obtained by passive sedimentation. All the results of research clearly demonstrates the connection between fungal pollution of space and inhalation of spores and fragments as risks to human health, individuals being susceptibility to develop an allergic or non-allergic respiratory disease with fungal etiology in the coming years. In **Chapter X** "Final conclusions and recommendations, are summarized the main results of research from which are separated a series of recommendations on the proper conduct of monitoring the degree of fungal pollution in indoor spaces. It is essential that both sources and routes of exposure could be determined correctly. The major goals of the research was focused on improving the quality of human and animal life and also being directed at developing new techniques/methods for mycological diagnosis and a natural approach to this will be that the results of this research will be presented at competent authorities as a legislative initiatives for establishing safe limits concerning fungal pollution in working and living spaces and adopting a new effective diagnostic methods for the prevention of the respiratory segment diseases.