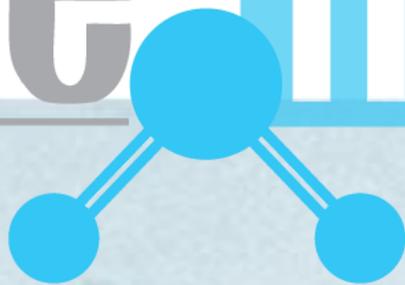


Pure HealthTM CARE



ORION

VIRUS AND BACTERIA SELF-SHIELDING SYSTEM

L'ossidazione fotocatalitica

Applicazioni in ambiente sanitario.

Leopoldo Corsi

Questa pagina è lasciata intenzionalmente in bianco

1 Sommario

2	Prefazione	7
3	Rischio di infezioni correlate all'assistenza	9
3.1	Il problema	9
3.2	Trasmissione delle infezioni correlate all'assistenza	10
3.3	Vie di trasmissione.....	12
3.4	Sopravvivenza dei microrganismi sulle superficie	17
4	Interventi su ambienti	20
4.1	Sanificazione	20
4.2	Pulizia	20
4.3	Disinfezione	20
4.4	I disinfettanti	22
5	Disinfezione fotocatalitica (PCD) con biossido di titanio.....	24
5.1	Meccanismo della fotocatalisi	24
5.2	Azione fotocatalitica sui microrganismi	25
5.2.1	Batteri Gram-negativi.....	25
5.2.2	Batteri Gram-positivi	26
5.2.3	Funghi, alghe e protozoi.....	27
5.2.4	Virus	27
5.2.5	Tossine batteriche	28
5.3	Meccanismo di uccisione dei batteri	28
5.3.1	Variazioni della permeabilità cellulare.....	29
5.3.2	Variazioni microscopiche durante la PCD	29
5.3.3	Studi spettroscopici.....	31
5.4	Ruolo dei ROS nel meccanismo di uccisione	31
5.5	Importanza del contatto tra batteri e TiO ₂	32
5.6	Mineralizzazione della cellula	33
5.7	Effetto del flusso della radiazione UV-A.....	34
6	Bibliografia	38

Questa pagina è lasciata intenzionalmente in bianco



Informazioni sull'autore

Leopoldo Corsi nasce nel 1970 a Pisa. Nel 1998 si laurea in Chimica presso l'Università degli Studi di Pisa e, nello stesso anno, inizia a lavorare come ricercatore presso la Next Technology Tecnotessile di Prato dove, nel 2003, assume il ruolo di Responsabile del Dipartimento di Ricerca Chimica e Tecnologica. Nel 2009 consegue la specializzazione in Medicina di Laboratorio-Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica presso l'Università degli studi di Pisa. Autore di 20 pubblicazioni scientifiche, inventore di 7 brevetti internazionali ed europei – di cui tre (EP1797936, PCT/IB2011/054794 e PCT/IT2012/000219) sulla realizzazione di materiali con superfici nanostrutturate fotocatalitiche - e correlatore di 6 tesi di laurea. Attualmente coordina le attività di ricerca del Dipartimento di Ricerca Chimica e Tecnologica della Next Technology Tecnotessile, riguardanti lo sviluppo di nuovi materiali e processi per applicazioni nei settori della salute e della sicurezza delle persone.

Questa pagina è lasciata intenzionalmente in bianco

2 Prefazione

Questo lavoro vuole essere un riferimento generale per assistere ed educare medici, biologi, operatori sanitari, ingegneri e progettisti al processo di ossidazione fotocatalitica per il controllo delle malattie infettive.

Questo è il *background scientifico* che sta alla base dei risultati ottenuti dal sottoscritto e dai propri collaboratori, in oltre 10 anni di ricerca e sviluppo nel settore delle nanotecnologie condotto all'interno del Centro Ricerche Next Technology di Prato.

I risultati di queste ricerche si sono concretizzati inizialmente in tre brevetti (EP1797936, PCT/IB2011/054794 e PCT/IT2012/000219) per la realizzazione di materiali tessili e non, aventi superfici fotocatalitiche; quindi in prodotti commerciali riconducibili al marchio Pure-Health, grazie all'azienda Orion di Calenzano che ha creduto fortemente in questo progetto.

Pure-Health è un sistema di disinfezione fotocatalitica costituito da un materiale per il rivestimento delle pareti e dei pavimenti e da un sistema di illuminazione a lampade fluorescenti a spettro completo (UVA-Vis). Il materiale di rivestimento, che può essere vetroresina (quindi rigido) o polivinilcloruro (ovvero flessibile) è caratterizzato dal fatto che la superficie a vista ha proprietà fotocatalitiche dovute alla presenza di biossido di titanio nanoparticellare. La peculiarità di queste superfici sta nel fatto che il biossido di titanio è nanostrutturato con le componenti organiche costituenti la superficie stesse. L'attivazione fotocatalitica di queste superfici viene fatta mediante l'impiego di lampade fluorescenti a spettro completo, lampade che possono essere installate in qualsiasi ambiente e, soprattutto, possono essere impiegate in presenza di persone.

Tutto ciò non ha costituito un punto di arrivo, bensì un punto di partenza, che ha come obiettivo quello di poter dare ad ogni persona la possibilità di vivere in ambienti sani e sicuri, invertendo la tendenza dei nostri edifici di fungere da vettori delle malattie. Ed il mio pensiero si rispecchia nelle parole del Dr. Wladyslaw Jan Kowalski, ricercatore all' Indoor Environment Center (IEC) della Pennsylvania State University, quando dice:

“Non trovo un obiettivo più nobile per i nostri tempi che quello di vincere la guerra contro le malattie, una guerra che, a differenza delle continue pandemie che non portano all'umanità alcun beneficio, ha un fine invece di essere un mezzo, salva le vite invece di sprecarle, e trascende tutte le barriere ideologiche, teologiche e culturali”¹.

Leopoldo Corsi



¹ Kowalski W.J. Aerobiological Engineering Handbook / W.J. Kowalski – New York: The McGraw-Hill Companies, Inc, 2006 – p.xii

Questa pagina è lasciata intenzionalmente in bianco

3 Rischio di infezioni correlate all'assistenza

Tra i diversi rischi associati all'assistenza sanitaria e socio-sanitaria quello infettivo, ossia il rischio per pazienti e operatori di contrarre un'infezione nel corso di un episodio assistenziale o in ambito lavorativo, occupa un posto particolare in ragione delle dimensioni del rischio, della complessità dei determinanti e del trend epidemiologico in aumento.

3.1 Il problema

Le principali caratteristiche del rischio infettivo sono sintetizzate in Tabella 1. Come si vede, le **infezioni correlate all'assistenza (ICA)** sono molto frequenti, sia in pazienti ricoverati in ospedale, che in assistiti presso strutture residenziali territoriali ed in assistenza domiciliare.

Tabella 1 - Principali caratteristiche del rischio infettivo (Ghirardini & al., 2012)

Frequenza elevata	
• Ospedale	⇒ 5-8/100 pazienti ricoverati
• Strutture residenziali	⇒ 8-12/100 studiati in un giorno
• Assistenza domiciliare	⇒ 1/100 pazienti assistiti
Trend epidemiologico in aumento	
• Rischio di contrarre un'infezione per giornata di degenza in ospedale in aumento	⇒ Da 7,2/1000 giornate di degenza nel 1975 a 9,8 nel 1995 negli Stati Uniti
• Aumento della frequenza di infezione gravi	⇒ Sepsis: 5% di tutte le infezioni nel 1975; 14% nel 1990-96 negli Stati Uniti
• Aumento delle infezioni antibiotico-resistenti	⇒ In un recente studio europeo, il 53% dei medici intensivisti intervistati ha dichiarato di aver trattato nell'ultimo mese almeno un paziente con un'infezione totalmente o quasi totalmente resistente agli antibiotici
• Aumento degli spostamenti dei pazienti nella rete dei servizi	⇒ La frequenza di microrganismi antibiotico-resistenti nelle strutture residenziali è in costante aumento, come anche la probabilità che un residente trasferito in ospedale sia colonizzato o infetto con microrganismi farmacoresistenti.
Frazione prevenibile elevata	Oltre 1/3 delle infezioni sono prevenibili e tale quota è maggiore in contesti ove non vengono rispettati gli standard assistenziali di base o per specifici siti di infezione

Il trend epidemiologico delle ICA osservato è attribuibile a diversi fattori: un aumento della proporzione di pazienti immunocompromessi o comunque fragili, l'accentuata complessità assistenziale, l'aumento delle infezioni sostenute da microrganismi resistenti agli antibiotici (per effetto della pressione antibiotica e della trasmissione di microrganismi in ambito assistenziale), gli spostamenti frequenti dei pazienti nella rete dei servizi.

Oggi le ICA costituiscono una grande sfida di salute pubblica, perché rappresentano un insieme piuttosto eterogeneo di condizioni diverse sotto il profilo microbiologico, fisiologico ed epidemiologico, condizioni che hanno un elevato

impatto sui costi sanitari e sono indicatori della qualità del servizio offerto ai pazienti ricoverati.

L'incidenza delle ICA varia da sede a sede ed è influenzata dalla diagnosi principale del paziente, dalle patologie associate e dall'esposizione a procedure chirurgiche e/o diagnostico-terapeutiche.

Dal punto di vista epidemiologico, le ICA che solitamente prevalgono sono quelle a carico del tratto urinario (in media il 27% nelle indagini nazionali di prevalenza), seguite dalle infezioni delle vie respiratorie (24%), dalle infezioni del sito chirurgico (17%), dalle batteriemie (10%) e da altre infezioni (incluse le infezioni intestinali, sempre più frequentemente sostenute da *Clostridium difficile* caratterizzato dal **ribotipo** 027, le infezioni della cute e del sottocutaneo, le infezioni del sistema nervoso centrale).

Ribotipo

Termine introdotto da Barbieri (1981) quale sistema intermedio tra il *genotipo* e il *fenotipo*; tale concetto è stato ripreso da Herbert e Ritch (1999), i quali hanno definito il "ribotipo" come "l'insieme della sequenza nucleotidica dell'RNA di un individuo", sottolineando l'importanza della sua funzione negli organismi eucarioti.

Esse rappresentano una delle principali cause di morte e sono responsabili di un considerevole aumento dei costi per il servizio sanitario, poiché determinano un incremento della durata della degenza in ospedale.

Secondo il rapporto annuale 2008 dell'European Center for Diseases Control and Prevention (ECDC), in ciascun giorno la prevalenza in ospedale di pazienti che hanno contratto una infezione è pari a 7,1%, con un range che va da 3,5% a 10,5% nei diversi studi.

L'ECDC stima che ogni anno più di 4 milioni di pazienti nella Comunità Europea a 27 Paesi acquisiscano una infezione in ospedale, per un totale di 4,5 milioni di infezioni e che ogni anno, come conseguenza di queste infezioni, si verifichino approssimativamente 37.000 decessi causati direttamente dall'infezione e 110.000 decessi per i quali l'esistenza dell'infezione ha giocato un ruolo favorente.

Sempre secondo l'ECDC le infezioni determinano approssimativamente 16 milioni di giornate di degenza ospedaliera aggiuntive all'anno (una media di 4 giorni per infezione) e costi significativi per i servizi sanitari dei Paesi membri. Assumendo un costo medio di 435 euro al giorno, il costo totale annuale delle infezioni acquisite in ospedale per l'Europa può essere stimato in 7 miliardi di euro all'anno, senza considerare i costi indiretti dovuti alla perdita di guadagno per le assenze dal lavoro, l'eventuale decesso, né i costi intangibili per le sofferenze fisiche ed emotive associate. I mezzi diagnostici a disposizione oggi consentono di ottenere diagnosi mediamente nel 90% dei casi. Tale percentuale è ulteriormente incrementata dal monitoraggio e dalla sorveglianza microbiologica. L'aspetto più scottante di questo problema è però che, nonostante gli indiscussi progressi della medicina, l'incidenza e la mortalità delle infezioni ospedaliere (4^a causa di morte nel mondo occidentale) non tende a ridursi, sebbene si calcoli che ben il 30% di esse sarebbero prevenibili (135.000- 210.000 infezioni prevenibili in Italia).

3.2 Trasmissione delle infezioni correlate all'assistenza

Tutte le strutture sanitarie (ospedali, cliniche, ambulatori, studi dentistici, ecc.) sono soggette a rischio infettivo dovuto alla presenza di patogeni che possono rappresentare una minaccia sia per i pazienti che per gli operatori sanitari.

Rischio di infezioni correlate all'assistenza

Le infezioni correlate all'assistenza possono essere distinte in **endogene** ed **esogene**, a seconda che il microrganismo responsabile provenga dal paziente stesso oppure da altre sorgenti di infezione (personale di assistenza, altri pazienti, ambiente). Le infezioni endogene, o auto infezioni, originano dalla penetrazione in siti sterili di batteri normalmente residenti sulle superfici delle mucose; fra le auto infezioni possiamo anche comprendere i **processi suppurativi** causati da batteri residenti sulla pelle del paziente stesso. Tutti questi microrganismi possono raggiungere il torrente circolatorio, i tessuti profondi, le cavità naturalmente sterili a seguito di interventi (es. cateterismo vescicale, broncoscopia), per abbassamento dei poteri di difesa locali e generali, per ustioni, ecc..

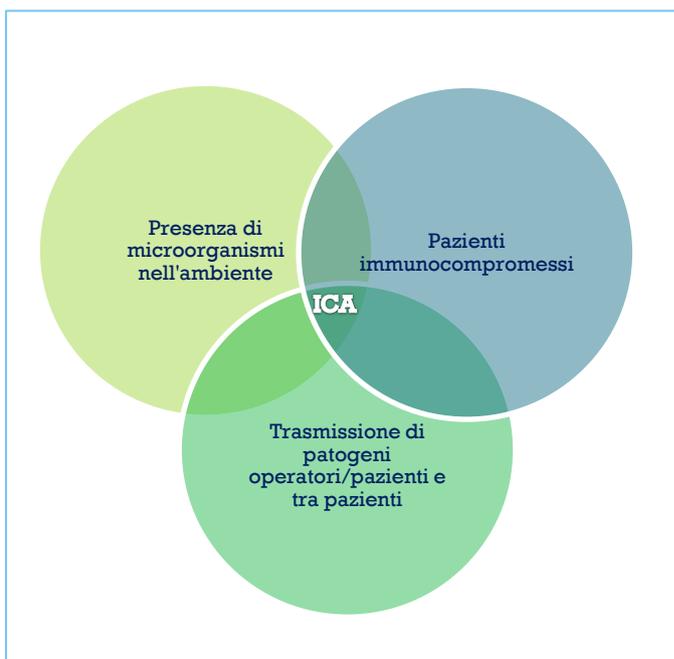
Processo suppurativo

Processo patologico che consiste nella formazione di pus entro un tessuto infiammato.

La varietà di specie ed il numero di unità microbiche veicolate con le mani variano da individuo ad individuo ed a seconda delle situazioni, ma dipendono essenzialmente dall'abitudine alla pulizia personale. Dopo le mani, come veicoli di infezione esogene vengono: il vestiario del personale di assistenza, lo strumentario medico, gli oggetti d'uso e le superfici con cui il malato viene a contatto.

Il ruolo di ciascuno di essi è diverso, e può essere maggiore o minore, a seconda del tipo di

malato, degli interventi a cui è sottoposto e dell'ambiente in cui è tenuto.



Tra gli elementi dell'ambiente più di frequente chiamati in causa, in quanto di volta in volta sospettati della trasmissione di infezioni correlate all'assistenza, vi sono

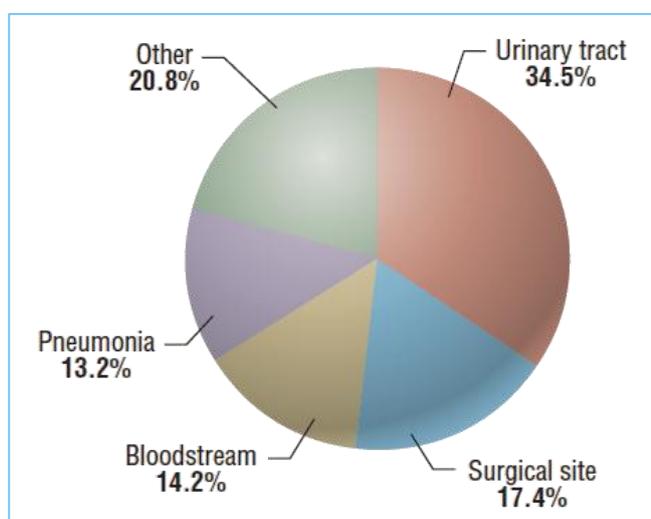


Figura 1 – Tipi di infezioni nosocomiali (CDC, 1996).

l'aria, l'acqua e le superfici (pavimenti, pareti ed altre superfici). Le infezioni esogene, quindi, partono da un reservoir microbico ospedaliero e sono responsabili del 10-20% dei casi di infezioni nosocomiali (40% nelle UTI – Unità di terapia Intensiva). Le infezioni correlate all'assistenza, tra cui quelle acquisite in ospedale (Figura 1), o *nosocomiali*, costituiscono un problema persistente che, a volte, può portare ad epiloghi tragici. Le principali sedi di partenza sono:

locali umidi e di difficile pulizia, le apparecchiature e parti di esse difficilmente sterilizzabili.

3.3 Vie di trasmissione

L'origine della trasmissione delle ICA di tipo esogeno è da attribuire a microrganismi provenienti dall'ambiente esterno attraverso la trasmissione:

- da pazienti portatori sani colonizzati al momento del ricovero, ammessi ai reparti, non sottoposti a misure di sorveglianza, di isolamento e di eradicamento del/i germe/i;
- da pazienti che hanno sviluppato l'infezione, nei confronti dei quali non sono state prese misure di isolamento da distanza o da contatto;
- dal contatto con superfici ed oggetti attraverso le mani;
- nel corso di procedure invasive, al momento dell'impianto e della manutenzione di un dispositivo.

In Figura 2 è riportato un flow-chart che descrive le principali vie di trasmissione di agenti patogeni.

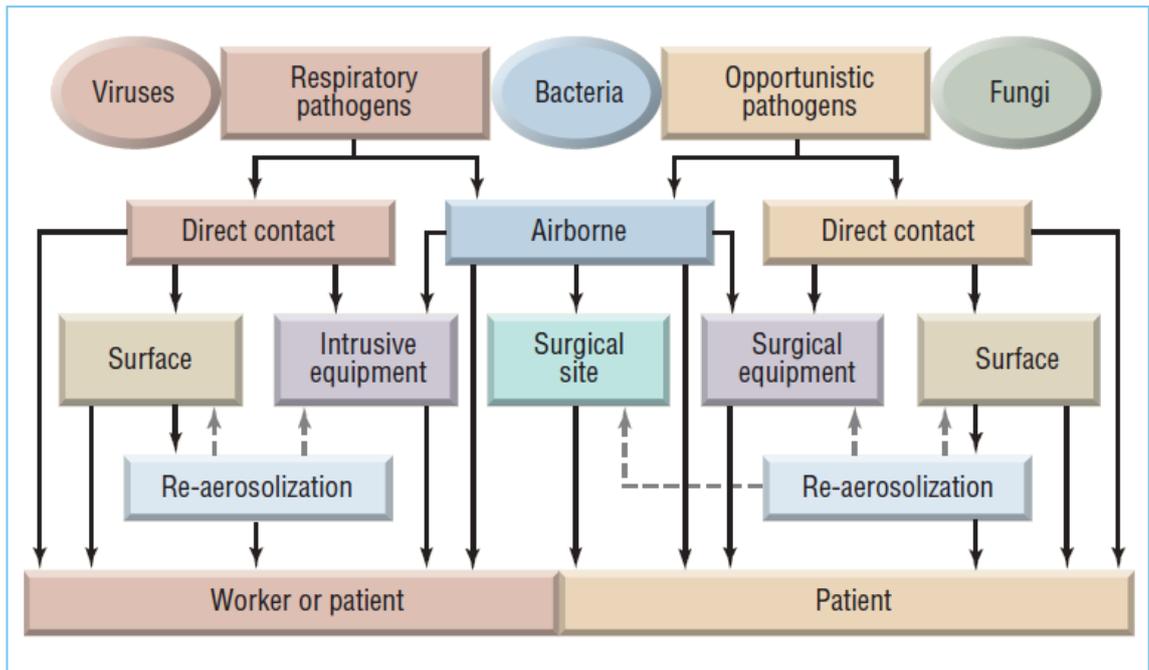


Figura 2 - Le vie principali di trasmissione di patogeni nosocomiali possono essere complesse e multifattoriali (Kowalski, 2006)

Sono riportati solo percorsi di primo e secondo ordine, anche se è possibile che un microbo sia più volte re-aerosolizzato o passi da persona a persona prima di causare un'infezione. Non sono stati indicati tutti i percorsi possibili, né ogni percorso mostrato è probabile: tuttavia, la Figura 2 illustra la potenziale complessità dell'eziologia delle infezioni nosocomiali.

I microbi aerodispersi che si depositano sulle superfici o sulla pelle vengono indicati con il termine **fomiti**. Questi possono essere goccioline o nuclei di goccioline essiccate che contengono uno o più microbi patogeni. Sia il contatto con le mani dei fomiti presenti sulle superfici che la loro re-aerosolizzazione dovuta a

Rischio di infezioni correlate all'assistenza

perturbazioni (e successiva inalazione) sono considerati percorsi significativi per la trasmissione di malattie infettive.

Qualsiasi **patogeno aerodisperso** è in grado di produrre una infezione nosocomiale. La maggior parte degli agenti patogeni opportunisti che causano infezioni della sede chirurgica (**Surgical Site Infections, SSI**) sono almeno in parte aerodispersi.

Alcune spore di muffe ambientali, quali l'*Aspergillus*, possono causare infezioni opportunistiche nei soggetti immunodepressi. La Figura 3 mostra le specie di patogeni responsabili di infezioni nosocomiali: quasi tutte sono potenzialmente aerodisperse, sebbene la maggior parte delle infezioni sono probabilmente il risultato di un contatto diretto e con le attrezzature.

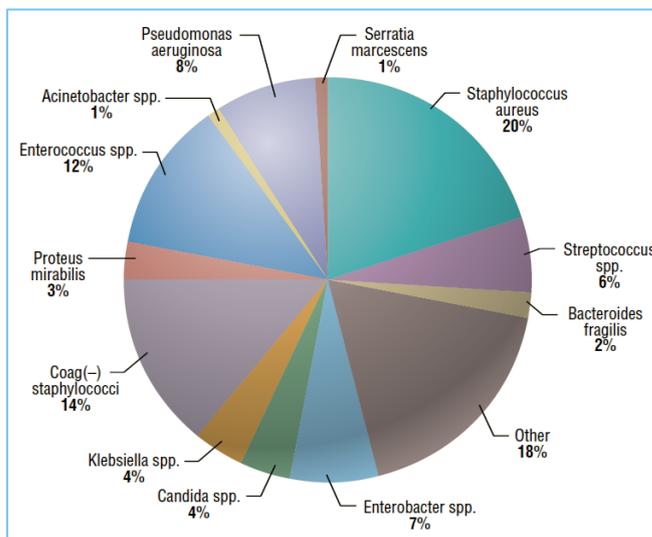


Figura 3 - Cause principali di infezioni nosocomiali (Mangram & al., 1999).

La Figura 4 mostra i principali batteri e virus nosocomiali ordinati graficamente per incidenza e proporzione relativa ai loro diametri medi in scala logaritmica.

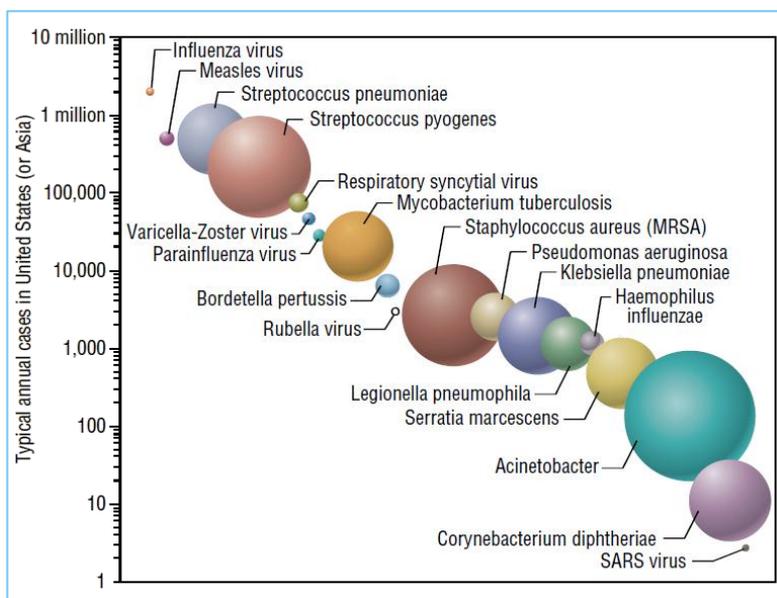


Figura 4 - Principali agenti patogeni nosocomiali. Le sfere rappresentano la dimensione relativa dei microbi (Kowalski, 2006).

bioaerosol (Sherertz, & al., 2001). La Figura 5 illustra le possibili fonti: queste fluttuazioni possono spiegare come i patogeni riescano a raggiungere la ferita aperta di un paziente chirurgico. Analogamente accade quando una persona parla, starnutisce o tossisce.

Classificare questi patogeni in termini di vittime o di costi è molto più complesso e potrebbe produrre gerarchie piuttosto differenti.

Il **bioaerosol** che viene rilasciato da una persona tende a rimanere sospeso intorno a questa prima di precipitare verso il basso ed a depositarsi sulle superfici dove può crescere e, a causa di perturbazioni, riprendere la forma di

Bioaerosol

Un bioaerosol (abbreviazione di *aerosol biologico*) è una sospensione di particelle in aria che contiene organismi viventi. Queste particelle sono molto piccole ed hanno dimensioni che variano da meno di 1µm a 100 µm.

Rischio di infezioni correlate all'assistenza

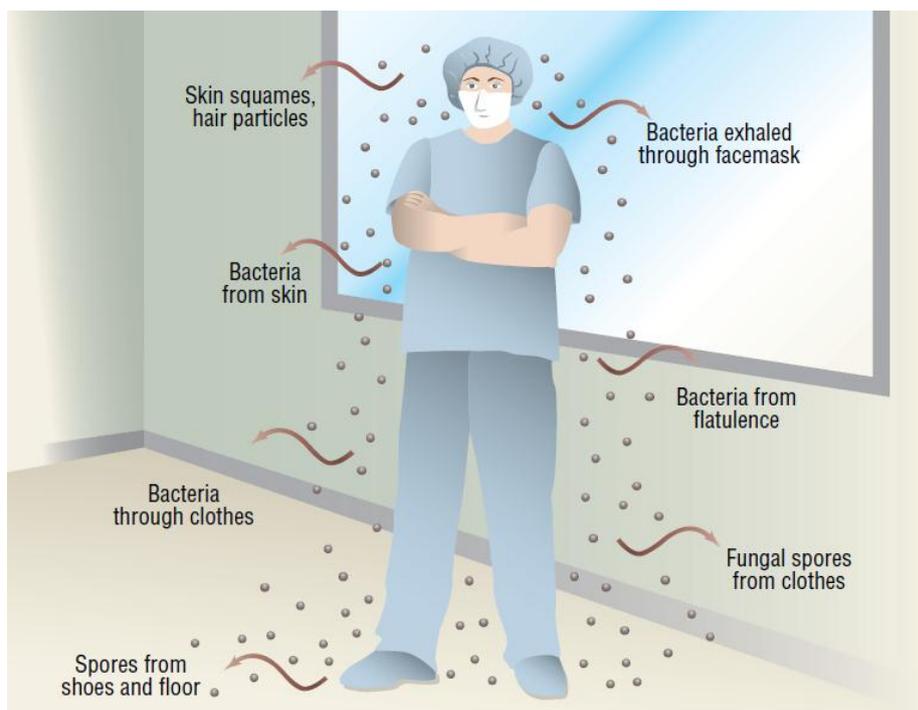


Figura 5 – Differenti bioaerosol prodotti da parte dei lavoratori ospedalieri.

I microbi contenuti nei bioaerosol tendono, nel tempo, a depositarsi per azione della gravità: più piccolo è il microbo, più è probabile che rimanga in aria. A questo importante fattore dobbiamo associarne un altro, altrettanto importante, che è il tempo di infettività in aria. I microbi che si trovano in forma di bioaerosol, tendono a morire in aria, sia per l'azione di fattori ambientali che per l'assenza di nutrienti nel bioaerosol. A volte questo effetto viene chiamato fattore di aria aperta (**Open Air Factor, OAF**) (Cox & Baldwin, 1967) (Cox, 1995),

Diversi studi hanno dimostrato che differenti batteri patogeni possono essere trasferiti sulle mani del personale sanitario attraverso il contatto con superfici ambientali in assenza di contatto diretto con i pazienti (Tabella 2).

Al contempo, altri studi hanno documentato come gli agenti patogeni siano trasportati dalle persone e riversati nell'ambiente – dove possono sopravvivere sulle superfici per lunghi periodi, diffondendosi tra le persone e l'ambiente – e come una miglior igiene riduca i tassi di infezione dovute a questi agenti patogeni (Tabella 3).

Rischio di infezioni correlate all'assistenza

Tabella 2 - Trasferimento sulle mani di agenti e marcatori (surrogati) patogeni presenti su superfici in

Riferimento	Ambito, Luogo	Organismo(i)	Metodo	No.	No. contaminati (%)	Commento
(Rusin & al., 2002)	Laboratorio, USA	Batteri e fago	Forniti sperimentalmente contaminati con una miscela di batteri e fago e toccati da volontari	10-20	...	Efficienza di trasferimento era maggiore per i non foriti porosi (28% -66%); batteri Gram positivi avuto la più alta efficienza di trasferimento (41%)
(Jiang & al., 1998)	Centro di cura per bambini, USA	Virus (surrogato)	Il DNA è stato essiccato su giocattoli, in seguito fatti tenere ai ricercatori	5	5 (100)	Successivo trasferimento di DNA a giocattoli puliti avvenuto in 3 occasioni su 5
(Rheinbaben & al., 2000)	Laboratorio, Germania	Fago	Volontari messi in contatto con un maniglia sperimentalmente contaminata	14	14 (100)	Dalle mani di volontari è stato recuperato un 30% - 66% del virus inoculato
Contaminazione di meticillin-resistente Staphylococcus aureus: possibile infezione centrali ospedaliere	Stanze di degenza, USA	MRSA	Sono stati eseguite colture sulle mani dopo la visita di routine del paziente senza diretto contatto con il paziente	12	5 (42)	Tutti e 12 gli operatori sanitari indossavano i guanti
(Ray & al., 2002)	Stanze di degenza, USA	VRE	Sono state effettuate colture sulle mani dopo 5 secondi di contatto con la sponda del letto e del comodino in camere di pazienti con VRE	13	6 (46)	5 delle 6 colture sulle mani erano indistinguibili dalle colture ambientali eseguite mediante PFGE
(Barker & al., 2004)	Laboratorio, UK	Norovirus	Toccare con le dita pulite toccare superfici contaminate e, quindi, altri oggetti	30	12 (40)	Maniglie delle porte (4 su 10), telefoni (5 su 10) e rubinetti (3 su 10) trovati contaminati
(Bhalla & al., 2004)	8 reparti, USA	Patogeni	Sono state effettuate colture sulle mani dopo 5 secondi di contatto con la sponda del letto e del comodino	64	34 (53)	Risultati positivi delle colture delle mani il 24% di 25 camere che erano state pulite dopo dimissione dei pazienti
contamination after contact with patients colonized with vancomycin-resistant enterococcus or the	UTI, USA	VRE	Sono state eseguite colture delle mani per 44 operatori sanitari che avevano risultati negativi delle colture delle mani all'inizio dello studio e durante la terapia di routine hanno toccato solo superfici ambientali	44	23 (52)	Ogni contatto con il paziente o le superficie ambientali ha rappresentato un rischio del 10% di contrarre VRE

LEGENDA: UTI, unità di terapia intensiva; MRSA, methicillin-resistant Staphylococcus aureus; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; VRE, vancomycin-resistant enterococci.

Tabella 3 - Studi sul ruolo svolto da superfici contaminate nella trasmissione endemica di patogeni nosocomiali

Riferimento	Ambito, Luogo	Organismo(i)	Impostazione dello studio	Risultati principali
(Samore & al., 1996)	Su scala ospedaliera, USA	C. difficile	6 mesi di studio prospettico osservazionale	Frequenza di trasmissione correlata all'intensità della contaminazione ambientale
(Mayfield & al., 2000)	3 unità, USA	C. difficile	18 mesi di studio prospettico prima e dopo il passaggio dalla disinfezione con QAC a quella con candeggina	Significativa riduzione dell'incidenza di CDI nell'unità a rischio più elevato (da 8,6 a 3,3 casi ogni 1.000 pazienti/giorni)
(Wilcox & al., 2003)	2 unità, USA	C. difficile	2 anni di studio prospettico incrociato di reparto passando da una da disinfezione con detergente ad una con candeggina	Significativa riduzione dell'incidenza di CDI in una delle unità (da 8,9 a 5,3 casi ogni 100 ammissioni), ma non nell'altra
(Boyce & al., 2008)	Su scala ospedaliera, USA	C. difficile	20 mesi di studio prospettico prima e dopo l'uso routinario della decontaminazione con HPV	Significativa riduzione dell'incidenza di CDI in 5 unità ad alta incidenza (da 2,3 a 1,3 casi ogni 1.000 pazienti/giorni); riduzione di incidenza di CDI inferiore in tutto l'ospedale
(Manian & al., 2010)	Su scala ospedaliera, USA	C. difficile /VRE	24 mesi di studio prospettico prima e dopo l'uso routinario della decontaminazione da HPV	Riduzioni significative di C. difficile (da 1,0 a 0,5 casi ogni 1.000 pazienti/giorni) e VRE (da 0,3 a 0,15 casi per 1.000 pazienti/giorni); riduzioni sostanziali ma non statisticamente significative in MRSA e Acinetobacter
(Bonten & al., 1996)	UTI, USA	VRE	2 mesi di studio prospettico osservazionale	Il 23% di 13 pazienti ricoverati in camere contaminate da VRE, ha acquisito VRE
(Hayden & al., 2006)	UTI, USA	VRE	9 mesi di studio prospettico prima e dopo un migliore educazione sulla pulizia e l'igiene delle mani	Ridotta la frequenza di contaminazione ambientale; l'acquisizione di VRE da parte del paziente è stata ridotta da 33 a 17 acquisizioni per 1.000 pazienti/giorni durante la fase di migliore pulizia
(Passaretti & al., 2008)	UTI, USA	VRE	12 mesi di studio prospettico di coorte per valutare l'effetto di decontaminazione da HPV	HPV è risultata protettiva contro l'acquisizione di VRE quando il paziente che precedentemente occupava la camera aveva VRE (IRR per pazienti ricoverati in camere decontaminate con HPV rispetto ai metodi standard, 0,22)
(Hardy & al., 2006)	UTI, UK	MRSA	14 mesi di studio prospettico osservazionale	Più del 10% delle acquisizioni potevano essere derivate direttamente dall'ambiente
(Mahamat & al., 2007)	Su scala ospedaliera, UK	MRSA	8 anni di analisi prospettica di serie temporali interrotte di molteplici interventi di controllo delle infezioni	L'introduzione della disinfezione con candeggina, i campionamenti ambientali, gel alcolici, e lo screening di ammissione riducono tutti la prevalenza di MRSA
(Dancer & al., 2009)	2 reparti, UK	MRSA	Studio prospettico incrociato di 12 mesi dell'effetto di 1 detergente supplementare	La pulizia avanzata è stata associata a riduzioni significative della contaminazione di superfici, dei fallimenti, delle operazioni di igiene e dell'acquisizione di MRSA

LEGENDA: CDI, Clostridium difficile infection; HPV, hydrogen peroxide vapor; UTI, unità di terapia intensiva; IRR, incidence rate ratio; MRSA, methicillin-resistant Staphylococcus aureus; QAC, quarternary ammonium compound; VRE, vancomycin-resistant enterococci.

3.4 Sopravvivenza dei microrganismi sulle superficie

Indipendentemente dalle divergenti opinioni riguardanti il trattamento di disinfezione più appropriato da utilizzare, un parametro importante per una corretta valutazione scientifica resta la persistenza dei patogeni nosocomiali sulle superfici. Più un patogeno nosocomiale persiste su una superficie, più può costituire fonte di trasmissione, e quindi compromettere un paziente suscettibile od un operatore sanitario.

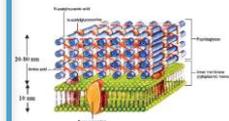
La maggior parte dei batteri **Gram-positivi**, come l'*Enterococcus spp.* (compreso il VRE), lo *Staphylococcus aureus* (MRSA incluso), o lo *Streptococcus pyogenes*, sopravvive per mesi sulle superfici asciutte (Tabella 4). In generale, non vi è alcuna differenza evidente nella sopravvivenza tra ceppi multiresistenti e suscettibile di *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus spp.* (Neely & al., 2000).

Tabella 4 - Persistenza di batteri clinicamente rilevanti su superfici asciutte ed inanimate (Kramer & al., 2006).

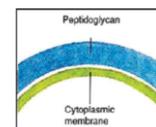
Tipo di batterio	Durata della persistenza (range)
<i>Acinetobacter spp.</i>	3 giorni ÷ 5 mesi
<i>Bordetella pertussis</i>	3 ÷ 5 giorni
<i>Campylobacter jejuni</i>	Fino a 6 giorni
<i>Clostridium difficile</i> (spore)	5 mesi
<i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>C. trachomatis</i>	≤ 30 ore
<i>Chlamydia psittaci</i>	15 giorni
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	7 giorni ÷ 6 mesi
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	1 ÷ 8 giorni
<i>Escherichia coli</i>	1,5 ore ÷ 16 mesi
<i>Enterococcus spp. inclusi VRE e VSE</i>	5 giorni ÷ 4 mesi
<i>Haemophilus influenza</i>	12 giorni
<i>Helicobacter pylori</i>	≤ 90 minuti
<i>Klebsiella spp.</i>	2 ore ÷ > 30 mesi
<i>Listeria spp.</i>	1 giorno ÷ mesi
<i>Mycobacterium bovis</i>	>2 mesi
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1 giorno ÷ 4 mesi
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1 ÷ 3 giorni
<i>Proteus vulgaris</i>	1 ÷ 2 giorni
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 ore ÷ 16 mesi (su pavimento asciutto 5 settimane)
<i>Salmonella typhi</i>	6 ore ÷ 4 settimane
<i>Salmonella typhimurium</i>	10 giorni ÷ 4,2 anni
<i>Salmonella spp.</i>	1 giorno
<i>Serratia marcescens</i>	3 giorni ÷ 6 mesi (su pavimento asciutto 5 settimane)
<i>Shigella spp.</i>	2 giorni ÷ 5 mesi
<i>Staphylococcus aureus, incluso MRSA</i>	7 giorni ÷ 7 mesi
<i>Streptococcus pneumonia</i>	1 ÷ 20 giorni
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3 giorni ÷ 6,5 mesi
<i>Vibrio cholerae</i>	1 ÷ 7 giorni

Gram-positivi

Si definiscono Gram-positivi [Gram (+)] quei batteri che rimangono colorati di blu o viola dopo aver subito la colorazione di Gram.

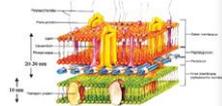


I batteri Gram (+) presentano una membrana cellulare fosfolipidica circondata da una parete cellulare costituita prevalentemente da peptidoglicano, il quale conferisce alla cellula, tra le altre caratteristiche, elevata rigidità e resistenza alla disgregazione meccanica

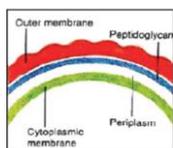


Gram-negativi

Si definiscono Gram-negativi [Gram (-)] quei batteri che rimangono colorati di rosa dopo aver subito la colorazione di Gram.



I batteri Gram (-) hanno una parete cellulare con uno spessore minore rispetto a quella dei Gram (+) e presentano una seconda membrana esterna. Una delle caratteristiche principali di tali batteri è la presenza, nello strato esterno della membrana, di lipopolisaccaridi (LPS), endotossine in grado di innescare una risposta immunitaria nell'organismo ospite.



Molte specie di batteri **Gram-negativi**, come l'*Acinetobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, o *Shigella spp.*, possono sopravvivere sulle superfici inanimate anche per mesi. Queste specie si trovano tra quelle isolate con maggior frequenza in pazienti con infezioni nosocomiali (Rüden & al., 1997). Tuttavia, pochi altri, come la *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus vulgaris*, o *Vibrio cholerae*, persistono solo per giorni.

I micobatteri - tra cui il *Mycobacterium tuberculosis* ed i batteri sporigeni, compreso il *Clostridium difficile* - possono sopravvivere anche per molti mesi sulle superfici.

La *Candida albicans*, il più importante patogeno fungino nosocomiale, può sopravvivere fino a 4 mesi sulle superfici (Tabella 5). Altri lieviti hanno mostrato una persistenza simile (*Torulopsis glabrata*, 5 mesi) o più breve (*Candida parapsilosis*, 14 giorni).

Tabella 5 - Persistenza di funghi clinicamente rilevanti su superfici asciutte ed inanimate (Kramer & al., 2006).

Tipo di fungo	Durata della persistenza (range)
<i>Candida albicans</i>	1 ÷ 120 giorni
<i>Candida parapsilosis</i>	14 giorni
<i>Torulopsis glabrata</i>	102 ÷ 150 giorni

Tra le cause di una persistenza maggiore sono da ascrivere la presenza di siero o di albumina, basse temperature e tassi elevati di umidità (Blaschke-Hellmessen & al., 1985).

La maggior parte dei virus delle vie respiratorie, come *Coronavirus*, *Coxsackievirus*, *Influenzavirus*, *SARS* e *Rinovirus*, può persistere sulle superfici per un paio di giorni. I virus del tratto gastrointestinale, come *Astrovirus*, *HAV*, *Poliovirus* e *Rotavirus* persistono per circa 2 mesi. I virus di origine ematica, come ad esempio *HBV* o *HIV*, possono persistere per più di una settimana. Gli Herpes virus quali *CMV* o *HSV* tipo 1 e 2 hanno dimostrato di poter persistere da poche ore fino a 7 giorni (Tabella 6).

Le mani, venendo a contatto con superfici contaminate da agenti patogeni nosocomiali, possono divenire vettori per la trasmissione incrociata (Bures & al., 2000) (Catalano & al., 1999) (Boyce & al., 1997). Un singolo contatto di una mano con una superficie contaminata dà luogo ad un trasferimento di agenti patogeni di grado variabile: questa trasmissione risulta più efficace con *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* (tutti al 100%) (Scott & Bloomfield, 1990), *Candida albicans* (90%) (Rangel-Frausto & al., 1994), *Rinovirus* (61%) (Gwaltney & Hendley, 1982), *HAV* (22% - 33%) (Mbithi & al., 1992), e *Rotavirus* (16%) (Ward & al., 1991) (Ansari & al., 1988). Mani contaminate da virus possono trasferire questi ultimi a più di 5 superfici (Barker & al., 2004) o ad altri 14 soggetti (von Rheinbaben & al., 2000), e possono essere fonte di re-contaminazione delle superfici, come è stato dimostrato per *HAV* (Mbithi & al., 1992) (Barker & al., 2004).

Infine, è importante sottolineare come, durante le epidemie, l'ambiente può svolgere un ruolo rilevante per la trasmissione di agenti patogeni nosocomiali, come suggerito da evidenze sperimentali. Questo è stato descritto per vari tipi di

Rischio di infezioni correlate all'assistenza

microrganismi, come *Acinetobacter baumannii* (Fierobe & al., 2001) (Lemmen & al., 2004) (Ling & al., 2001), *Clostridium difficile* (Hanna & al., 2000) (Verity & al., 2001) (Kaatz & al., 1988), *MRSA* (Lemmen & al., 2004) (Fitzpatrick & al., 2000), *Pseudomonas aeruginosa* (Engelhart & al., 2002) (Lemmen & al., 2004), *VRE* (Duckro & al., 2005) (Martinez & al., 2003), *SARS* (Mukhopadhyay & al., 2004) (Chen & al., 2004), *Rotavirus* (Butz & al., 1993) (Wilde & al., 1992), e *Norovirus* (Chadwick & al., 2000).

Tabella 6 - Persistenza di virus clinicamente rilevanti su superfici asciutte ed inanimate (Kramer & al., 2006).

Tipo di virus	Durata della persistenza (range)
Adenovirus	7 giorni ÷ 3 mesi
Astrovirus	7 ÷ 90 giorni
Coronavirus	3 ore
SARS associated virus	72 ÷ 96 ore
Coxsackie virus	> 2 settimane
Cytomegalovirus	8 ore
Echovirus	7 giorni
HAV	2 ore ÷ 60 giorni
HBV	> 1 settimana
HIV	> 7 giorni
Herpes simplex virus, type 1 and 2	4,5 ore ÷ 8 settimane
Influenza virus	1 ÷ 2 giorni
Norovirus and feline calici virus (FCV)	8 ore ÷ 7 giorni
Papillomavirus 16	> 7 giorni
Papovavirus	8 giorni
Parvovirus	> 1 anno
Poliovirus type 1	4 ore ÷ < 8 giorni
Poliovirus type 2	1 giorno ÷ 8 settimane
Pseudorabies virus	≥ 7 giorni
Respiratory syncytial virus	Fino a 6 ore
Rhinovirus	2 ore ÷ 7 giorni
Rotavirus	6 ÷ 60 giorni
Vacciniavirus	3 ÷ > 20 settimane

4 Interventi su ambienti

Le infezioni correlate all'assistenza costituiscono un problema rilevante in termini sanitari, sociali ed economici.

È caduta l'illusione che la disponibilità di nuovi antibiotici sia in grado di risolvere ogni tipo di infezione. Anzi, il largo uso di antibiotici fatto negli ultimi anni ha portato alla selezione di ceppi multiresistenti.

Si è consolidata la convinzione della necessità di affrontare globalmente il problema con una strategia complessiva, che riconosce nelle procedure di pulizia e disinfezione (ovvero nella sanificazione) uno strumento fondamentale di profilassi delle malattie infettive.

4.1 Sanificazione

La sanificazione è un processo che elimina grandi quantità di materiale che non fanno parte di un elemento, compresa la polvere, un gran numero di microrganismi e la materia organica che li protegge. Per sanificazione si intende l'attuazione simultanea o, meglio, i due momenti distinti della pulizia e della disinfezione di qualunque superficie.

4.2 Pulizia

Con il termine pulizia ci si riferisce alla rimozione dello sporco visibile dalle superfici. Poiché lo sporco è composto da una miscelazione di polveri, lipidi, germi, ed altro materiale organico (con la possibile inclusione di pus, sangue o altri liquidi biologici), la pulizia richiede la presenza di saponi, detergenti (o di prodotti ad azione enzimatica) assicurando, qualora sia correttamente condotta, una riduzione superiore al 90% della flora microbica. La pulizia è quindi:

- un processo irrinunciabile e fondamentale per ridurre la flora microbica esistente;
- da eseguirsi con l'impiego di specifici prodotti;
- da far precedere ad ogni altro trattamento poiché è dimostrata la capacità di siero, sangue ed altri prodotti biologici di inattivare alcuni disinfettanti, e comunque di ridurre l'attività per l'azione protettiva che lo sporco assicura, impedendo il contatto del disinfettante con i microrganismi.

4.3 Disinfezione

Per disinfezione si intende il processo di distruggere i microrganismi patogeni, o potenzialmente patogeni, che sono presenti o si presume possano essere presenti, in un determinato ambiente o substrato. Non si intende, dunque, la distruzione di tutti i microbi, come è nel caso della sterilizzazione, ma soltanto di quelli che si ha motivo di temere in quelle condizioni. In pratica una disinfezione è accettabile quando consente di ottenere una riduzione marcata della carica microbica. La disinfezione viene condotta con il calore, inferiore a 100°C (pastorizzazione), tecnica preferibile per ragioni di efficacia e di costo, o con l'uso di sostanze chimiche quando il primo metodo non è praticabile per le caratteristiche dei materiali.

Interventi su ambienti

Molti elementi possono condizionare questo processo. Alcuni sono fattori intrinseci ai microrganismi, che mostrano una crescente resistenza ai disinfettanti secondo l'ordine batteri > virus liofili > funghi > virus idrofili > micobatteri > endospore. In



molti casi la resistenza è legata a fattori strutturali del germe e l'esposizione ai germicidi può indurre la selezione di ceppi resistenti: la reversibilità del fenomeno è documentata, mentre è oggetto di studio la possibile interazione tra resistenza agli antibiotici e resistenza ai germicidi.

Altri fattori riguardano il pH delle soluzioni, la temperatura, la concentrazione dei prodotti, il tempo di esposizione, la presenza di sostanze organiche, la conformazione dell'oggetto, anche se il livello di pulizia del substrato (in particolare da

sostanze come pus o sangue) è assolutamente critico.

Occorre anche osservare come i disinfettanti non devono essere miscelati, e che la possibilità di essere inattivati varia grandemente da molecola a molecola; da questo punto di vista gli alcoli presentano un'ottima resistenza.

La disinfezione viene spesso suddivisa in 3 livelli:

- alto
- medio
- basso

Il livello alto raggiunge l'obiettivo di eliminare tutti i microrganismi con eccezione delle spore batteriche.

Il livello medio o intermedio assicura la distruzione della maggior parte di batteri e funghi, del *Mycobacterium tuberculosis* ma non delle spore batteriche.

Il livello basso interessa alcuni funghi, virus, batteri ma non il *Mycobacterium tuberculosis* e le spore.

Si usa distinguere, a seconda delle finalità, la disinfezione continua da quella terminale e quella occasionale.

La **disinfezione continua** si attua a letto del malato ed è strettamente correlata ad alcuni aspetti epidemiologici della malattia in causa, soprattutto a quelli concernenti le vie di eliminazione e di penetrazione dell'agente patogeno.

La **disinfezione terminale** ha lo scopo di risanare l'ambiente dove ha soggiornato un malato infetto, dopo la guarigione, il trasferimento o il decesso; occorre in tali

casi provvedere non solo alla disinfezione del locale o dei locali, ma anche a quella degli effetti letterecci (lenzuola, materassi) e d'uso del malato, eseguibile in loco a cura del personale specializzato o presso apposite stazioni.

La **disinfezione occasionale** o periodica viene praticata a regolari intervalli di tempo o quando se ne manifesti la necessità nei locali pubblici, sale cinematografiche, aule scolastiche, mezzi di pubblico trasporto.

4.4 I disinfettanti

I disinfettanti (Tabella 7) sono ampiamente utilizzati in ambito ospedaliero e sanitario come strumenti di controllo e prevenzione delle disinfezioni; dal punto di vista della regolamentazione, vengono considerati presidi medico chirurgici, quelli compresi tra i preparati che sono destinati a tutelare la salute e la sicurezza. Per tale motivo la commercializzazione è consentita previa registrazione del Ministero della Salute, che si ottiene dopo che il prodotto ha superato una serie di verifiche di efficacia, di tossicità, di stabilità chimica, ecc.. Per tale motivo, le informazioni fornite dal produttore all'utilizzatore, devono essere autorizzate dal Ministero.

Il disinfettante riduce la quantità di microrganismi, pur non essendo sempre efficace sulle spore; l'effetto è sempre condizionato dal fatto che il suo utilizzo sia preceduto da una pulizia a fondo.

Il principio fondamentale per un corretto e razionale impiego di antisettici e disinfettanti è che non esiste un disinfettante valido per tutte le occasioni: la sua scelta è sempre dipendente dall'impiego per il quale è indicato. Si ricorda che l'efficacia dell'antisettico e del disinfettante dipende da numerosi fattori che riguardano la sede, il dispositivo stesso, il materiale da trattare e la popolazione microbica.

Tabella 7 - Spettro d'azione di antisettici e disinfettanti

	In condizioni d'uso come disinfettanti							Come sporidici
	Virus con capside	Gram (+)	Gram (-)	Funghi	Virus senza capside	Micobatteri	Spore	
ALCOOL ETILICO	■	■	■	■	■	■	■	
ALCOOL ISOPROPILICO	■	■	■	■	■	■	■	
GLUTARALDEIDE	■	■	■	■	■	■	■*	
CLOREXIDINA SOL. ALC.	■	■	■	■	■	■	■	
CLOREXIDINA SOL. ACQ.	■	■	■	■	■	■	■	
IPOCLORITO	■	■	■	■	■	■	■	
POVIDONE IODIO (IODOFORL)	■	■	■	■	■	■	■	
COMP. AMMONIO QUAT.	■	■	■	■	■	■	■	

* aumentando il tempo di contatto

LEGENDA: ■ = Buona ■ = Variabile ■ = Insufficiente

IL DISINFETTANTE IDEALE

- ▲ AZIONE RAPIDA E PERSISTENTE
- ▲ ATTIVITÀ BIOCIDA
- ▲ AMPIO SPETTRO D'AZIONE
- ▼ NON DANNOSO ALLA CONC. D'USO
- ▲ FACILITÀ DI APPLICAZIONE
- ▲ RISPETTARE QUALITÀ E SICUREZZA
- ▲ ECONOMICITÀ DI GESTIONE
- ▲ BUONA STABILITÀ CHIMICA
- ▲ ELEVATO POTERE DI PENETRAZIONE
- ▼ NON INDURRE RESISTENZE

Ogni disinfettante:

- deve essere utilizzato alla concentrazione indicata sulle istruzioni d'uso;
- richiede un determinato tempo di contatto per agire in modo efficace.

Determinati ceppi batterici e virali possono essere sensibili a un tipo di antisettico o di disinfettante, mentre altri no. La maggior parte dei disinfettanti si inattiva in misura variabile in presenza di materiale organico; è di estrema importanza la scelta del disinfettante in funzione dello specifico utilizzo e la pulizia prima della disinfezione.

La pulizia è fondamentale per ridurre la carica batterica iniziale: il disinfettante risulta inefficace se utilizzato su oggetti non accuratamente puliti.

Le soluzioni disinfettanti possono venire contaminate da microrganismi non compresi nello spettro di attività del prodotto. Il problema della contaminazione si pone soprattutto per le soluzioni acquose di disinfettante a basso livello di efficacia che dovrebbero essere utilizzate entro 7-10 giorni dalla diluizione o dall'apertura della confezione. Tutti i disinfettanti se vengono usati in modo improprio oltre a essere inefficaci possono risultare tossici e nocivi su pazienti ed operatore.

5 Disinfezione fotocatalitica (PCD) con biossido di titanio

Le proprietà fotocatalitiche del biossido di titanio (TiO_2) sono ben note e hanno trovato molte applicazioni come la rimozione di contaminanti organici e la realizzazione di vetro autopulente. Oggi, vi è un crescente interesse per l'applicazione del TiO_2 quale **fotocatalizzatore** per la disinfezione di superfici, aria ed acqua (Figura 6). Recentemente sono state pubblicate reviews sull'applicazione della fotocatalisi come sistema di disinfezione (Gamage & Zhang, 2010) (Chong, Jin, Chow, & Saint, 2010) e sui meccanismi di azione del TiO_2 (Dalrymple & al., 2010).

Fotocatalizzatore

Un **catalizzatore** è una specie chimica che interviene durante lo svolgimento di reazione chimica aumentandone la velocità, rimanendo comunque inalterato al termine della stessa (a differenza dei reagenti, che si consumano al procedere della reazione). Un **fotocatalizzatore** è un catalizzatore che modifica la velocità di una reazione chimica attraverso l'azione della luce.

Il biossido di titanio fotoattivato ha dimostrato di essere in grado di uccidere un'ampia gamma di batteri Gram-negativi e Gram-positivi, funghi filamentosi e unicellulari, alghe, protozoi, virus e batteriofagi. Il meccanismo di abbattimento microbico comporta la degradazione della parete cellulare e della membrana citoplasmatica a causa della produzione di specie reattive dell'ossigeno, quali i **radicali** idrossilici e perossido di idrogeno. Questo porta inizialmente a perdite di contenuto cellulare, quindi a lisi cellulare che può essere seguita da mineralizzazione completa dell'organismo. L'abbattimento microbico risulta più efficace quando vi è uno stretto contatto tra gli organismi ed il catalizzatore TiO_2 .

Radicale

Si definisce radicale (o **radicale libero**) un'entità molecolare molto reattiva avente vita media di norma brevissima (dell'ordine dei ns), costituita da un atomo o una molecola formata da più atomi che presenta un elettrone spaiato: tale elettrone rende il radicale estremamente reattivo, in grado di legarsi ad altri radicali o di sottrarre un elettrone ad altre molecole vicine.

Polimorfismi

Il termine polimorfismo in mineralogia indica la possibilità che una stessa sostanza si presenti in forme cristalline diverse. Questo comportamento si può presentare tanto in sostanze allo stato elementare (elementi chimici), quanto nei loro composti. Il rutilo è la forma più comune: ciascun atomo di titanio è circondato ottaedricamente da sei atomi di ossigeno; l'anatasio (la forma più fotoattiva) ha struttura tetragonale, più allungata rispetto a quella del rutilo, mentre la brookite ha struttura ortorombica.

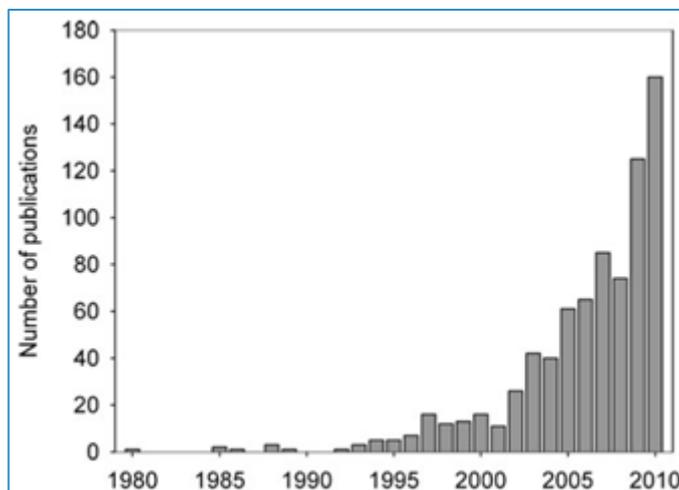


Figura 6 - Numero di pubblicazioni sulla disinfezione fotocatalitica

5.1 Meccanismo della fotocatalisi

Il biossido di titanio è un **semiconduttore** e, in natura, ne esistono tre diversi

polimorfismi: anatasio, rutilo e brookite. La maggior parte degli studi mostra che l'anatasio è la forma più efficace dal punto di vista fotocatalitico e che il rutilo è quella meno attiva; questa differenza è probabilmente dovuta all'estensione della reazione di combinazione tra elettrone e lacuna nelle due forme allotropiche (Miyagi, Kamei, Mitsuhashi, Ishigaki, & Yamazaki, 2004). L'assorbimento, da parte del TiO_2 , di un fotone con sufficiente energia promuove gli elettroni dalla banda di valenza (e_{vb}^-) alla banda di conduzione (e_{cb}^-), lasciando una lacuna caricata positivamente nella banda di valenza (h_{vb}^+ ; (1.1)) (Figura 7). Il salto energetico (l'energia richiesta per promuovere un elettrone) dell'anatasio è di circa 3,2 eV e ciò significa che il

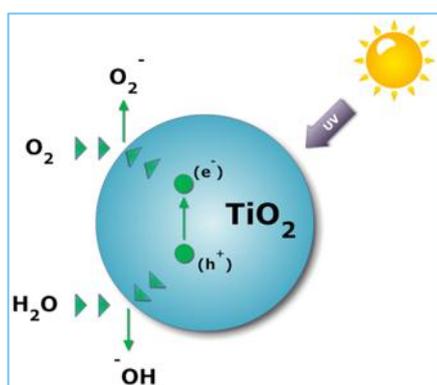
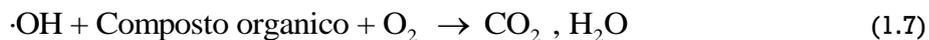
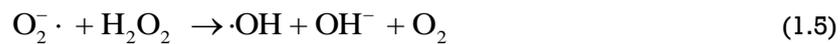


Figura 7 - Rappresentazione schematica del principio della fotocatalisi che mostra il diagramma del salto energetico di banda di una particella sferica di TiO_2 .

processo di fotocatalisi può essere attivato da fotoni con lunghezza d'onda di circa 385 nm (**UV-A, 315-400 nm**). Gli elettroni sono quindi liberi di migrare all'interno della banda di conduzione mentre le lacune possono essere riempite dalla migrazione di un elettrone da una molecola adiacente, lasciando una nuova lacuna, ed il processo può essere ripetuto. Quindi anche le lacune sono mobili. Elettroni e lacune possono ricombinarsi (processo di massa) attraverso una reazione non-produttiva che riduce l'efficienza del processo, o generare, quando raggiungono la superficie, specie reattive dell'ossigeno (**ROS**) quali il radicale superossido $O_2^{\cdot-}$ (1.2) ed il radicale idrossile $\cdot OH$ (1.3). Queste, reagendo con molecole d'acqua, producono H_2O_2 (1.4), oltre ai radicali idrossile (1.5) ed idroperossile (1.6). La reazione dei radicali con composti organici porta alla loro mineralizzazione (1.7).



5.2 Azione fotocatalitica sui microrganismi

La fotocatalisi ha dimostrato di essere in grado di uccidere una vasta gamma di organismi compresi batteri Gram-negativi e Gram-positivi (incluse le endospore), funghi, alghe, protozoi e virus, e si è rivelata anche in grado di inattivare i prioni (Paspaltsis, et al., 2006) e di distruggere tossine microbiche. Solamente cisti di *Acanthamoeba* e coniospore di *Trichoderma asperellum* hanno mostrato una certa resistenza, comunque non sono state studiate in modo estensivo. La capacità di eliminare tutti gli altri tipi di microrganismi indica che le superfici fotocatalitiche hanno la potenzialità di essere auto-sterilizzanti. Tuttavia, ad oggi, è più corretto riferirci alle superfici fotocatalitiche come sistemi auto-disinfettanti piuttosto che auto-sterilizzanti. In molti studi sono state impiegate culture pure di microrganismi, anche se ci sono lavori in cui viene evidenziata l'attività fotocatalitica verso culture miste (Van Grieken, Marugan, Pablos, & Lopez, 2010) e comunità naturali (Armon, Laot, Narkis, & Neeman, 1998) (Araña & al., 2002) (Cho & al., 2007a).

5.2.1 Batteri Gram-negativi

La maggior parte degli studi è stata condotta con l'*Escherichia coli* (Figura 8) (Sökmen, Candan, & Sümer, 2001) (Dunlop & al., 2010) (Pal & al., 2007). Altri esempi

ROS

Le specie reattive dell'ossigeno, i ROS, sono i radicali liberi a maggior diffusione. I più importanti ROS sono l'anione superossido $O_2^{\cdot-}$, il perossido d'idrogeno H_2O_2 e il radicale ossidrilico $\cdot OH$.

L'anione superossido ($O_2^{\cdot-}$) è prodotto dalla riduzione incompleta di O_2 durante la fosforilazione ossidativa, da alcuni enzimi (xantina ossidasi) e dai leucociti. Viene inattivato dalle superossido dismutasi (SOD) che, combinandolo con $2H^+$ e catalizzando la reazione tramite il suo cofattore metallico (Fe, Mn, Cu, Zn o Ni) lo converte in H_2O_2 e O_2 . Se non viene inattivato danneggia i lipidi di membrana, proteine e DNA, può inoltre stimolare la produzione di enzimi nei leucociti.

Il perossido d'idrogeno (H_2O_2) è spesso prodotto dalla glutazione perossidasi o da alcune ossidasi contenute nei perossisomi. Viene metabolizzato dalla catalasi dei perossisomi in H_2O e O_2 che catalizza la reazione tramite il suo gruppo eme e dalla glutazione perossidasi nel citosol e nei mitocondri.

Il radicale ossidrilico ($\cdot OH$) è generalmente un prodotto dell'idrolisi dell'acqua da parte di radiazioni, oppure è un prodotto della reazione di Fenton a partire dal perossido d'idrogeno (con lo ione ferroso Fe^{2+} quale catalizzatore). È il ROS più reattivo ed è prodotto dai leucociti a partire dal perossido d'idrogeno per distruggere patogeni, ma se in eccesso provoca danni alla membrana plasmatica, alle proteine e agli acidi nucleici. Viene inattivato per conversione in H_2O da parte della glutazione perossidasi.

di Gram-negativi che sono suscettibili alla PCD includono cocci, bacilli e forme filamentose di generi differenti (Tabella 8).

Tabella 8 – Alcuni dei Batteri Gram-negativi eliminabili mediante disinfezione fotocatalitica

Organismo	Riferimento
ACINETOBACTER	(CHENG & AL., 2009)
COLIFORMI	(ARAÑA & AL., 2002)
ENTEROBACTER AEROGENES	(IBÁÑEZ & AL., 2003)
ENTEROBACTER CLOACAE SMI	(YAO & AL., PHOTOCATALYTIC DISINFECTION OF PHYTOPHYTOPATHOGENIC VISIBLE LIGHT., 2007A)
COLIFORMI FECALI	(WATTS & AL., 1995)
FLAVOBACTERIUM SP.	(COHEN-YANIV & AL., 2008)
FUSOBACTERIUM NUCLEATUM	(BAI & AL., 2007)
LEGIONELLA PNEUMOPHILA	(CHENG & AL., 2007)
MICROCYSTIS	(KIM & AL., 2005)
P. AERUGINOSA (FIGURA 9)	(KÜHN & AL., 2003)
P. FLUORESCENS B22	(SKORB & AL., 2008)
SALMONELLA ENTERIDITIS TYPHIMURIUM	(CUSHNIE & AL., 2009)
SHIGELLA FLEXNERI	(CHENG & AL., 2009)
VIBRIO VULNIFICUS	(SONG & AL., 2008)

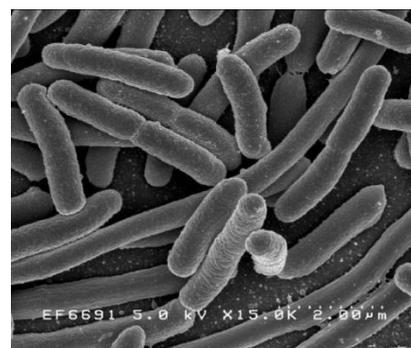


Figura 8 - E. coli visti al microscopio elettronico a scansione.

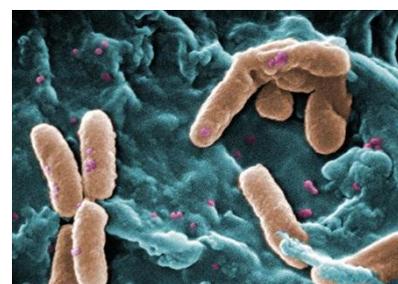


Figura 9 - Pseudomonas aeruginosa

5.2.2 Batteri Gram-positivi

Molti studi hanno evidenziato che i batteri Gram-positivi sono più resistenti alla disinfezione fotocatalitica rispetto ai Gram-negativi (Kim & al., 2003) (Liu & al., 2003) (Erkan & al., 2006) (Pal & al., 2007) (Muszkat & al., 2005) (Hu & al., 2007) (Sheel & al., 2008) (Skorb & al., 2008). Questo differente comportamento viene solitamente attribuito alla diversa struttura della parete cellulare che vi è tra batteri Gram-positivi e Gram-negativi. I batteri Gram-negativi hanno una parete cellulare a triplo strato costituita di una membrana interna (IM), uno strato sottile detto peptidoglicano (PG) e da una membrana esterna (OM), mentre i Gram-positivi possiedono un PG più sottile e sono privi di OM. Comunque, il numero di studi che mostra questa maggior sensibilità dei Gram-positivi è abbastanza limitato.

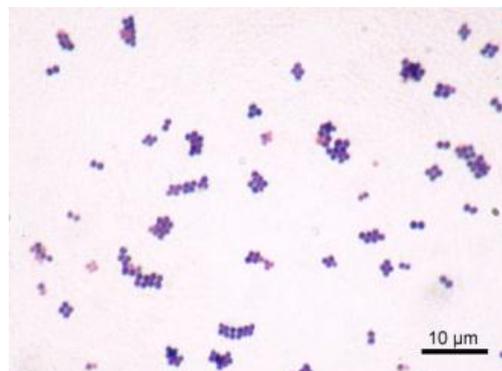


Figura 10 - Staphylococcus aureus

Nella Tabella 9 sono elencati i batteri Gram-positivi che sono stati eliminati mediante PCD: sono compresi 17 generi diversi, tra cui microorganismi sporigeni aerobi ed anaerobi. Le endospore si sono mostrate uniformemente più resistenti delle cellule vegetative all'azione della PCD.

Tabella 9 – Alcuni dei batteri Gram-positivi eliminabili mediante disinfezione fotocatalitica

Organismo	Riferimento
BACILLUS CEREUS	(CHO & AL., TITANIUM DIOXIDE/UV PHOTOCATALYTIC DISINFECTION IN FRESH CARROTS., 2007A)
BACILLUS CEREUS SPORES	(ARMOR & AL., 2004)
BACILLUS SUBTILIS VEGETATIVE CELLS AND ENDOSPORES	(WOLFRUM & AL., 2002)
BACILLUS SUBTILIS ENDOSPORES	(GREIST & AL., 2002)
CLOSTRIDIUM DIFFICILE	(DUNLOP & AL., 2010)
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS SPORES	(GUIMARÃES & AL., 2003)
ENTEROCOCCUS (STREPTOCOCCUS) FAECALIS	(SINGH & AL., 2005)
ENTEROCOCCUS HIRAE	(TSUANG & AL., 2008)
LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS	(CHOI & AL., 2007A)
LISTERIA MONOCYTOGENES	(KIM & AL., 2003)
MICROBACTERIUM SP. MICROBACTERIACEAE STR. W7	(PAL & AL., 2007)
MRSA	(OKA & AL., 2008)
MYCOBACTERIUM SMEGMATIS	(KOZLOVA & AL., 2010)
STAPHYLOCOCCUS AUREUS (FIGURA 10)	(SHIRAIISHI & AL., 1999)
STREPTOCOCCUS MUTANS	(CHUN & AL., 2007)

5.2.3 Funghi, alghe e protozoi

Vari studi hanno dimostrato la suscettibilità di funghi, alghe e protozoi alla PCD. Tra questi vi sono generi di funghi filamentosi, lieviti, amebe, Apicomplexa, diplomonadini, ciliati ed alghe, comprese le diatomee. Nella Tabella 10 sono riportati alcuni dei funghi eliminabili mediante PCD.

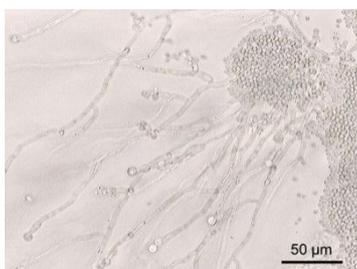


Figura 11 – Candida albicans

Tabella 10 - Alcuni dei funghi eliminabili mediante disinfezione fotocatalitica

Organismo	Riferimento
ASPERGILLUS NIGER	(CHEN & AL., 2009)
A. NIGER SPORES	(WOLFRUM & AL., 2002)
CANDIDA ALBICANS (FIGURA 11)	(LONNEN & AL., 2005)
CLADOSPORIUM CLADOSPOIROIDES	(GIANNANTONIO & AL., 2009)
EPICOCCUM NIGRUM	(GIANNANTONIO & AL., 2009)
FUSARIUM MUCOR	(GIANNANTONIO & AL., 2009)
PENICILLIUM OXALICUM	(GIANNANTONIO & AL., 2009)
PESTAOIOPSIS MACULANS	(GIANNANTONIO & AL., 2009)
SACCHARAROMYCES CEREVISIAE	(ERKAN & AL., 2006)
SPICELLUM ROSEUM	(SAWADA & AL., 2005)
TRICHODERMA ASPERELLUM	(GIANNANTONIO & AL., 2009)
TRICHODERMA HARZIANUM	(SAWADA & AL., 2005)

5.2.4 Virus

I virus suscettibili ad inattivazione mediante PCD sono riportati in Tabella 11. La maggior parte degli studi sono stati condotti su batteriofagi di *E. coli* in sospensione e questo ha permesso di dimostrare l'azione virucida della PCD per virus ssRNA a

Disinfezione fotocatalitica (PCD) con biossido di titanio

simmetria icosaedrica (MS2 e Q β), virus ssRNA filamentosi (fr), virus ssDNA (ϕ X174) e virus dsDNA (λ e T4). Per quanto riguarda i virus dei mammiferi gli studi sono stati condotti su poliovirus 1, virus dell'influenza umana (Figura 12) ed aviaria, coronavirus della SARS.

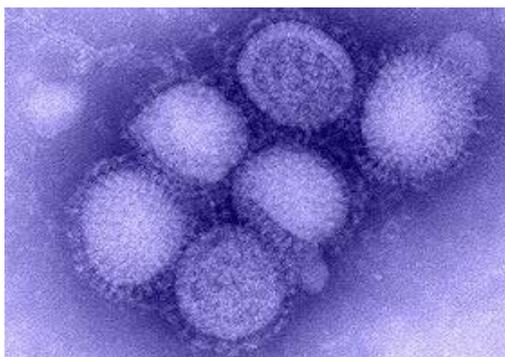


Figura 12 - Virus dell'influenza A sottotipo H1N1

Tabella 11 - Alcuni dei virus eliminabili mediante disinfezione fotocatalitica

Ospite	Virus	Riferimento
BIRDS	INFLUENZA (AVIARIA) A/H5N2	(GUILLARD & AL., 2008)
E. COLI	COLIFAGO	(GUIMARÃES & AL., 2003)
E. COLI	FR	(GERRITY & AL., 2008)
E. COLI	T4	(DITTA & AL., 2008)
E. COLI	λ VIR	(YU & AL., 2008)
E. COLI	λ NM1149	(BELHÁCOVÁ & AL., 1999)
E. COLI	ϕ X174	(GERRITY & AL., 2008)
E. COLI	MS2	(VOHRA & AL., 2006)
E. COLI	Q β	(OTAKI & AL., 2000)
UOMO	EPATITE B ANTIGENE HBsAg	(ZAN & AL., 2007)
UOMO	INFLUENZA A/H1N1	(LIN & AL., 2006)
UOMO	INFLUENZA A/H3N2	(KOZLOVA & AL., 2010)
UOMO	NOROVIRUS	(KATO & AL., 2005)
UOMO	POLIOVIRUS TIPO 1	(WATTS & AL., 1995)
UOMO	SARS CORONAVIRUS	(HAN & AL., 2004)
UOMO	VACCINIA	(KOZLOVA & AL., 2010)

5.2.5 Tossine batteriche

Diversi studi hanno dimostrato che l'attività fotocatalitica è in grado di inattivare tossine batteriche, tra cui endotossine di batteri Gram-negativi e tossine cianobatteriche (Tabella 12).

Tabella 12 - Tossine microbiche inattivate dalla fotocatalisi

Tossina	Riferimento
BREVETOSSINE	(KHAN & AL., 2010)
CILINDROSPERMOSINA	(SENOGLES & AL., 2001)
ENDOTOSSINA LIPOPOLISACCARIDE	(SUNADA & AL., 1998)
MICROCISTINA-LR	(FEITZ & AL., 2003)
MICROCISTINA LR, YA e YR	(SHEPHARD & AL., 1998)
NODULARINA	(LIU & AL., 2005)

5.3 Meccanismo di uccisione dei batteri

La modalità di azione del TiO₂ fotoattivato è stata studiata sia per i batteri Gram-positivi che per quelli Gram-negativi. Come meccanismo di uccisione dei batteri, inizialmente fu proposta la deplezione del coenzima A mediante dimerizzazione e conseguente inibizione della respirazione (Matsunaga & al., 1988). Tuttavia, ci sono

prove inconfutabili che l'azione letale è dovuta al rottura della membrana e delle pareti cellulari. Queste evidenze derivano da studi di microscopia, di rilevazione dei prodotti di **perossidazione lipidica**, di perdita di componenti intercellulari (ad esempio, cationi, RNA e proteine), di permeabilità di molecole a basso peso molecolare (ad esempio, o-nitrofenil-galattoside - ONPG) e da studi spettroscopici.

5.3.1 Variazioni della permeabilità cellulare

Prove indirette di danni della membrana cellulare provengono da studi di perdita di componenti cellulari. In un lavoro (Saito & al., 1992) è stato messo in evidenza che vi è una rapida perdita di K^+ da cellule trattate di *AHT Streptococcus sobrinus* e che tale perdita ha luogo entro 1 minuto di esposizione ed è concomitante con la perdita di vitalità. A ciò ha fatto seguito un rilascio più lento di RNA e proteine. Anche in concomitanza con la morte cellulare di *E. coli* è stata constatata una perdita di K^+ (Hu & al., 2007) (Kambala & al., 2009). In un altro autorevole studio (Huang & al., 2000), in cui cellule di *E. coli* sono state sottoposte a PCD, è stato riscontrato che ad un aumento iniziale della permeabilità di piccole molecole come ONPG ha fatto seguito una fuoriuscita di molecole più grandi come la β -D-galattosidasi, suggerendo un progressivo aumento della permeabilità della membrana.

5.3.2 Variazioni microscopiche durante la PCD

Studi condotti con l'ausilio di analisi **SEM** e **TEM** hanno evidenziato un iniziale rigonfiamento della membrana cellulare, seguito dalla formazione di fori nella OM, in particolare quando le particelle di TiO_2 si trovavano in contatto con le cellule.

Mediante immagini TEM di cellule di *S. sobrinus* è stato possibile verificare che la parete cellulare viene parzialmente rotta in conseguenza di un trattamento fotocatalitico di 60 min. con TiO_2 , presentando ulteriori squilibri dopo 120 min. di trattamento (Saito & al., 1992). Gli autori hanno suggerito che la morte cellulare possa essere causata da alterazioni nella permeabilità cellulare e dalla decomposizione della parete cellulare. Immagini SEM di *S. aureus*, *MRSA*, *E. coli* e *M. luteus* hanno mostrato, dopo irradiazione UV-A su TiO_2 , cambiamenti morfologici correlabili ad interruzione della parete cellulare (Kangwansupamonkon & al., 2009).

Danni alla parete cellulare di *P. aeruginosa* sono stati evidenziati mediante analisi SEM e TEM (Figura 13), che mostravano cambiamenti nella struttura della membrana quali "bubble-like protuberances which expelled cellular material" (Amezaga-Madrid & al., 2002) (Amezaga-Madrid & al., 2003).

SEM e TEM

SEM (acronimo inglese di *Scanning Electron Microscope*) e **TEM** (acronimo inglese di *Transmission Electron Microscope*) sono due tipi di microscopi elettronici. Il potere di risoluzione (la minima distanza fra due punti per la quale si possono distinguere come tali e non come uno solo) di un normale microscopio elettronico SEM a catodo di tungsteno si aggira intorno ai 5 nm, ma alcuni modelli arrivano a 1 nm. Il potere di risoluzione di un microscopio elettronico a trasmissione TEM è di circa 0,2 nm, cioè circa 500 mila volte maggiore di quello dell'occhio umano.

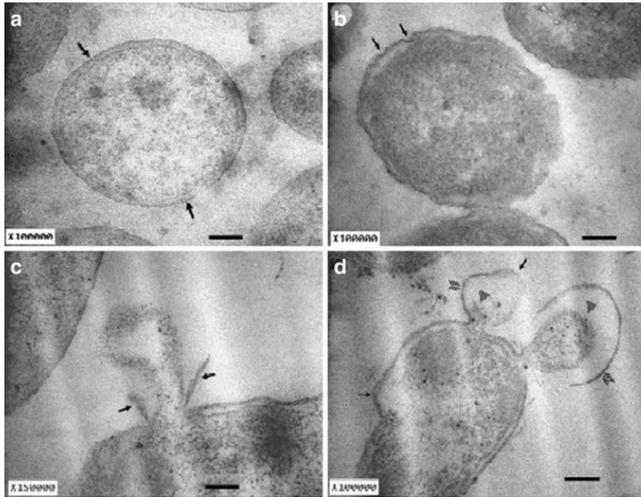


Figura 13 - Microscopio elettronico a trasmissione di cellule *P. aeruginosa* trattate con TiO_2 . La sezione trasversale delle cellule non trattate mostrano spessore e forma della parete cellulare normali (freccie). b-d Dopo trattamento per 240 min, le cellule mostrano una parete cellulare con ondulazioni anormali (freccie) (b), fuoriuscita di materiale citoplasmatico dalla cellula con parete cellulare danneggiata (freccie) (c) e cellule che mostra due "bolle" di materiale cellulare sulla parete cellulare (freccie) (d). Unità di misura = 200 nm. Da (Amezaga-Madrid & al., 2003)

Gli studiosi hanno evidenziato una fuoriuscita di materiale cellulare ed una divisione cellulare anormale, anche se le bolle possono essere dovute a danni localizzati dello strato di peptidoglicano e ad un conseguente rigonfiamento della membrana interna. In un altro lavoro è stata studiata l'inattivazione di *E. coli* su film sottili di TiO_2 : è stato possibile dimostrare che si ha un danno iniziale della membrana esterna e, successivamente, una degradazione completa della membrana citoplasmatica: l'inattivazione fotocatalitica ha luogo senza un sostanziale degrado visibile del peptidoglicano. L'iniziale decomposizione della membrana esterna è stata comprovata mediante misure di microscopia a forza atomica di cellule su film di TiO_2 irraggiato (Sunada & al., 2003b).

Analisi TEM di sezioni sottili di cellule trattate su TiO_2 foto-attivato hanno consentito di evidenziare vari gradi di rottura della cellula, tra cui plasmolisi e detriti cellulari (Vacaroiu & al., 2009). Sempre mediante analisi TEM è stato possibile vedere la separazione della membrana citoplasmatica dallo strato peptidoglicano su cellule trattate di *S. aureus* (Chung & al., 2009). Analisi SEM hanno permesso di mostrare cambiamenti della membrana esterna di *E. coli* (Li & al., 2008) (Shah & al., 2008) (Gartner & al., 2009), la formazione di prodotti di degradazione della membrana (Erdem & al., 2006) e la distorsione di cellule sia di *MRSA* che di *S. aureus meticillino-sensibile* (*MSSA*) trattate su anatasio (Shah & al., 2008), ed in tutti i casi vi è evidenza di danno della parete cellulare.

Anche la microscopia a forza atomica è stata impiegata per evidenziare danni alla membrana di *E. coli*, *S. aureus* e *Diplococcus (Streptococcus) pneumoniae* su film sottili di TiO_2 (Miron & al., 2005).

La dimostrazione della distruzione dell'endotossina di *E. coli* senza sostanziale degradazione del peptidoglicano (Sunada & al., 1998) indica che, nel caso dei batteri Gram-negativi, la distruzione della cellula ha luogo secondo lo schema OM→PG→IM. Tuttavia, in micrografia elettronica può non essere semplice identificare alterazioni dello strato di peptidoglicano in quanto caratterizzato da una struttura altamente reticolata, per cui si possono avere danni apprezzabili anche senza modifica del suo aspetto generale. Una distruzione localizzata può aver luogo se le particelle di TiO_2 si trovano in contatto con la cellula: questo può portare ad

una protrusione della membrana interna attraverso la parete cellulare (Amezaga-Madrid & al., 2003), seguita da una rottura completa della parete stessa.

L'azione del TiO_2 può portare ad un danneggiamento del DNA ma è probabilmente un evento tardivo che segue la rottura della membrana e la morte della cellula (Wamer & al., 1997) (Hirakawa & al., 2004) (Wang & al., 2005) (Gogniat & al., *TiO₂ photocatalysis causes DNA damage via Fenton reaction-generated hydroxyl radicals during the recovery period.*, 2007) (Shen & al., 2008) (Yao & al., 2007c) (Yang & al., 2008) .

5.3.3 Studi spettroscopici

Mediante analisi diffrattometrica ai raggi X (Suwalsky & al., 2005), spettroscopia laser cinetica e spettroscopia ATR-FTIR è stato possibile correlare l'attività del biossido di titanio su un doppio strato fosfolipidico isolato alla distruzione della struttura del doppio strato stesso. Quest'ultima è dovuta alla perossidazione lipidica da parte dei ROS (Kiwi & al., *New evidence for TiO₂ photocatalysis during bilayer lipid peroxidation.*, 2004) (Nadtochenko & al., 2006), misurata dalla produzione di malondialdeide (MDA) quale prodotto di rottura della membrana cellulare, a cui corrisponde una perdita dell'attività respiratoria della membrana, misurata dalla riduzione del cloruro di 2,3,5-trifeniltetrazolinio (Maness & al., 1999). La perossidazione lipidica ha luogo quando acidi grassi polinsaturi, come l'acido linoleico, vengono attaccati dai ROS (Kiwi & al., 2005).

Spettri FTIR di *E. coli* trattato fotocataliticamente hanno confermato la produzione di MDA come prodotto di degradazione della membrana cellulare: MDA che è ulteriormente degradata da tempi di irraggiamento più lunghi (Hu & al., 2007).

Il decadimento elettronico del TiO_2 è stato studiato mediante spettroscopia laser cinetica in presenza di fosfatiletanolamina, lipopolisaccaride ed *E. coli* (Nadtochenko & al., 2006). Studi spettroscopici FTIR hanno evidenziato che i componenti organici legati al TiO_2 vengono direttamente ossidati per riduzione delle lacune elettroniche (Nadtochenko & al., *Inactivation of pathogenic microorganisms in the photocatalytic process on nanosized TiO₂ crystals.*, 2008). Questo lavoro suggerisce che l'ossidazione diretta dei componenti cellulari potrebbe aver luogo senza la produzione di ROS, ma solo se le cellule si trovano a diretto contatto con la superficie del TiO_2 . Questo è totalmente in linea con una maggiore efficacia della PCD quando le cellule sono in contatto con il TiO_2 piuttosto che in sospensione. Nel complesso, gli studi spettroscopici supportano gli studi di microscopia e confermano l'ordine di distruzione OM→IM→PG (Dalrymple & al., 2010).

5.4 Ruolo dei ROS nel meccanismo di uccisione

Il ruolo dei ROS nel meccanismo di uccisione dei batteri è schematizzato in Figura 14. La maggior parte degli studi mostrano che i ROS sono responsabili dell'uccisione dei microorganismi, e vari autori propongono che il ruolo principale sia svolto dai radicali ossidrilici ($\bullet\text{OH}$) (Ireland & al., 1993) (Kikuchi & al., 1997) (Maness & al., 1999) (Salih & al., 2002) (Cho & al., 2004) (Cho & al., 2005) (Cho &

Yoon, 2008). Infatti, l'aggiunta di dimetilsolfossido e cisteammmina (due scavengers di $\bullet\text{OH}$) ad una sospensione di TiO_2 in acqua, annulla l'attività della PCD (Salih & al., 2002). Tuttavia, gli $\bullet\text{OH}$ hanno una vita breve e probabilmente non diffondono oltre $1\ \mu\text{m}$ dalla superficie del TiO_2 , specialmente in presenza di sostanza organica (Pryor, 1986) (Kikuchi & al., 1997). Kikuchi et al. hanno mostrato che l'uccisione di *E. coli* ha luogo anche quando i batteri sono separati dalla superficie per mezzo di una membrana porosa di spessore $50\ \mu\text{m}$. Tuttavia, è stato visto anche che l'uccisione dei batteri è inibita dal mannitolo (scavenger di radicali liberi) solo in assenza di membrana e dalla catalase (che dovrebbe degradare H_2O_2) sia con che senza

membrana. Questo ha suggerito che $\bullet\text{OH}$ e H_2O_2 sono responsabili dell'eliminazione dei batteri in prossimità della superficie del TiO_2 , dove l'azione di H_2O_2 si estende per una certa distanza.

Un studio **ESR** sul meccanismo di azione di $\bullet\text{OH}$ e H_2O_2 prodotti mediante attivazione UV di uno strato sottile di TiO_2 ha evidenziato che gli $\bullet\text{OH}$ sono prodotti anche per fotolisi diretta di H_2O_2 oltre che dalle reazioni (1.3) e (1.4) (Yan & al., 2009).

Nel radicali idrossile è stata individuata la specie ROS maggiormente coinvolta nell'uccisione di cisti di *C. parvum* (Cho & Yoon, 2008).

Studi condotti impiegando *E. coli* superossido dismutasi (SOD)-carente hanno evidenziato che il danno

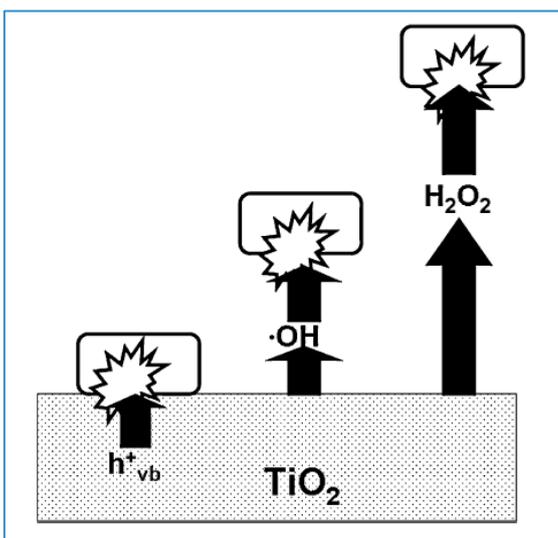


Figura 14 - Ruolo dei ROS nell'uccisione fotocatalitica dei batteri. Quando le cellule sono in diretto contatto con il catalizzatore può verificarsi un'ossidazione diretta dei componenti cellulari. Il radicale ossidrile ($\bullet\text{OH}$) ed il perossido d'idrogeno (H_2O_2) svolgono la loro azione in prossimità ed a distanza dal catalizzatore, rispettivamente (Sato & Taya, 2006c).

ossidativo della membrana, associato alla pressione interna della cellula, permeabilizza l'envelope cellulare, consentendo una fuoriuscita di metaboliti critici (Imlay & Fridovich, 1992).

5.5 Importanza del contatto tra batteri e TiO_2

Differenti studi hanno mostrato che uno stretto contatto tra i batteri ed il TiO_2 aumenta l'entità del danno ossidativo (Horie & al., 1996a) (Gumy & al., 2006a) (Pratap Reddy & al., 2008) (Caballero & al., 2009) (Cheng & al., 2009). Alcuni di questi studi hanno evidenziato che il TiO_2 risulta molto più attivo in sospensione rispetto a quando si trova immobilizzato su una superficie (Lee & al., 1997) (Otaki & al., 2000) (Sun & al., 2003) (Gumy & al., 2006b) (Marugan & al., 2006) (Marugan & al., 2008) (Cohen-Yaniv & al., 2008). Probabilmente questo è dovuto ad un maggior contatto tra le particelle di TiO_2 e le cellule batteriche in sospensione, oltre che ad una maggior area superficiale utile alla produzione di ROS.

ESR

La Risonanza Paramagnetica Elettronica o Risonanza di Spin Elettronico, nota come EPR (dall'acronimo inglese Electron Paramagnetic Resonance) o ESR (dall'inglese Electron Spin Resonance) è una tecnica spettroscopica impiegata per individuare e analizzare specie chimiche contenenti uno o più elettroni spaiati (chiamate specie paramagnetiche). Queste specie includono: radicali liberi, ioni di metalli di transizione, difetti in cristalli, molecole in stato elettronico di tripletto fondamentale (ad es. l'ossigeno molecolare) o indotto per fotoeccitazione.

Mediante microscopia ottica (Nadtochenko & al., 2005) (Gumy & al., 2006b) (Gogniat & al., 2006) ed elettronica è stato possibile dimostrare chiaramente il legame tra le particelle di titania e le cellule batteriche (Gumy & al., 2006a) (Saito & al., 1992) (Cheng & al., 2007) (Shah & al., 2008). In Figura 15 è riportata una micrografia elettronica che mostra particelle di TiO_2 adese ad una cellula di *E. coli*.

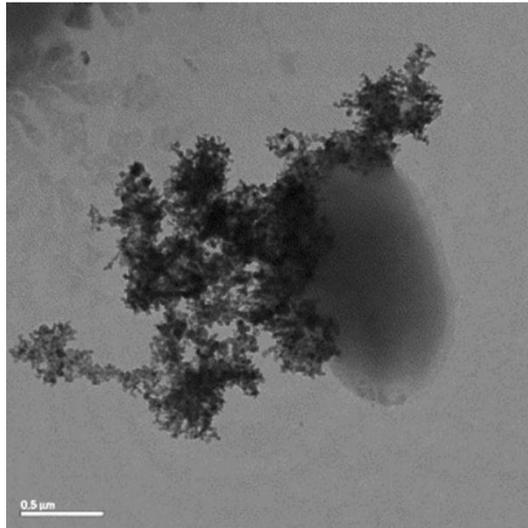


Figura 15 – TEM di *E. coli* che mostra l'adesione tra la cellula e TiO_2 in sospensione (Gumy & al., 2006b).

5.6 Mineralizzazione della cellula

In seguito ad un iniziale danno cellulare e successiva morte cellulare, la fotocatalisi ha dimostrato di essere in grado di mineralizzare completamente i batteri (Jacoby & al., 1998) (Wolfrum & al., 2002).

Il meccanismo di uccisione di batteri da parte del TiO_2 è schematizzato in Figura 16. Inizialmente, si possono avere dei danni dovuti al contatto tra le cellule ed il TiO_2 , danni che interessano la permeabilità della membrana, ma che sono reversibili. A questo fa seguito un danno maggiore, che interessa tutti gli strati della parete cellulare e consente una perdita di piccole molecole, come gli ioni. In questa fase, i

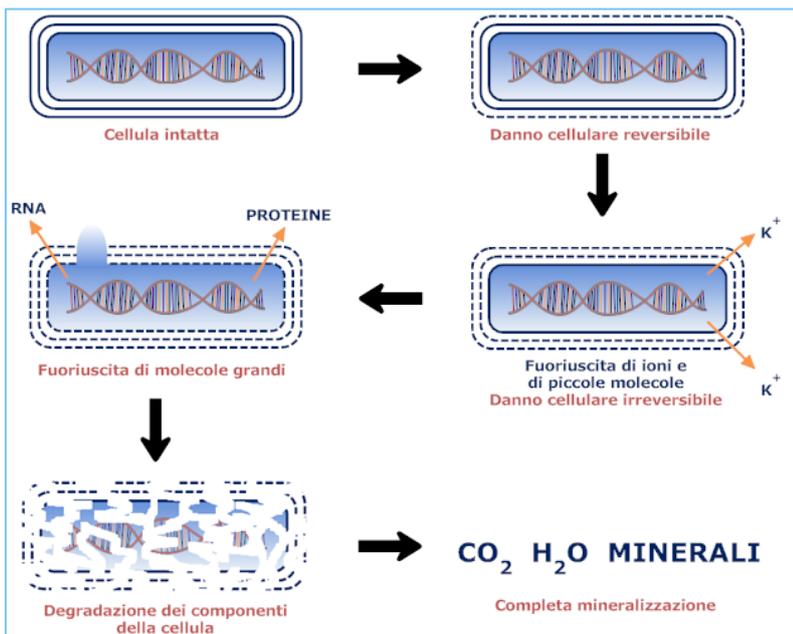


Figura 16 – Schema del meccanismo di uccisione e distruzione dei batteri da parte del TiO_2 .

danni possono essere irreversibili, e questo si accompagna alla morte delle cellule. Dato che il peptidoglicano è una molecola altamente reticolata, questi danni potrebbero non essere visibili in modo evidente in questa fase od essere localizzati (se il TiO_2 è in contatto con le cellule). Un ulteriore danno procurato alla membrana porta alla

fuoriuscita di componenti ad alto peso molecolare come le proteine. Questo può essere seguito da protrusione della membrana citoplasmatica nel mezzo circostante

attraverso aree degradate del peptidoglicano e, infine, dalla lisi cellulare. In questo caso, può verificarsi una degradazione dei componenti interni della cella seguita da completa mineralizzazione. Questo processo degradativo può aver luogo progressivamente, a partire dal lato della cellula che si trova in contatto con il catalizzatore.

5.7 Effetto del flusso della radiazione UV-A

L'inattivazione dei batteri mediante fotocatalisi eterogenea impiegando UV-A (315-400 nm) e TiO_2 è considerata una delle tecnologie di disinfezione più efficaci, in quanto durante il processo non si ha formazione di composti cancerogeni, mutageni o maleodoranti (Ibanez & al., 2003).

Differentemente, anche se le **lampade fluorescenti** sono già disponibili in commercio, è limitato il numero di studi che riportano un approfondito esame delle loro efficienze, soprattutto in termini di disinfezione microbica.

Una lampada fluorescente può emettere una frazione molto piccola di UV-A (Harm, 1980), perché è essenzialmente una lampada al mercurio a bassa pressione con la superficie interna rivestita con vari tipi di fosfori per assorbire la radiazione di 254 nm ed emettere a lunghezze d'onda maggiori (Bolton, 2002). Anche se l'involucro di vetro che circonda la lampada assorbe tutta l'emissione del lontano-UV, le comuni lampade fluorescenti (*daylight* o *cool white*) irradiano quantità apprezzabili a 313, 334, e 365 nm delle righe di emissione spettrale del mercurio. A queste lunghezze d'onda, un'emissione molto più intensa è tipica delle lampade *blacklight*, talvolta utilizzate nei locali per generare effetti fluorescenti.

L'efficienza di inattivazione batterica segue una cinetica del primo ordine rispetto al conteggio delle colonie batteriche (N_t), che è definito dall'equazione

$$\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = -kt$$

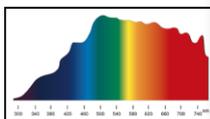
dove, N_t è il numero di UFC dopo irradiazione per t min.; N_0 è il numero di UFC a 0 min.; k è la costante di velocità di inattivazione; N_t/N_0 indica il rapporto di sopravvivenza.

In assenza di TiO_2 , l'esposizione a radiazione fluorescente sembra inattivare vari ceppi di batteri (Pal & al., 2007). La Figura 17 mostra che in 2 h circa vengono disattivati il 40-50% di *E. coli* K-12, *P. fluorescens* e *Paenibacillus* sp. SAFN-007, il 20% di *B. subtilis* e solo il 13% di *Microbacterium* sp.. In letteratura, infatti, alcuni studi riportano che l'esposizione a raggi UV-A può formare radicali reattivi dell'ossigeno all'interno delle cellule, causando uno stress ossidativo ed un conseguente danno cellulare (Kühn & al., 2003). Inoltre, è stato osservato che luce UV di lunghezza d'onda nel range 320-400 nm provoca danni ai microorganismi, soprattutto attraverso l'eccitazione di molecole fotosensibili presenti all'interno della cellula, generando così specie attive come $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , e $\bullet\text{OH}$, che incidono negativamente sul genoma e su altre molecole intracellulari e che portano a mutazioni cellulari, ritardo della crescita, ecc. (Oguma & al., 2002).

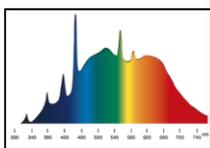
Lampade fluorescenti

La lampada fluorescente è un tipo di lampada a scarica in cui l'emissione luminosa (visibile) è indiretta, cioè l'emittente non è il gas ionizzato, ma un materiale fluorescente (da cui il nome).

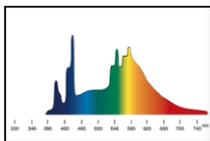
Le lampade a fluorescenza, grazie al loro spettro caratteristico ed ai bassi livelli di radiazione UV-A e UV-B (simile alla luce diurna naturale) stimolano il metabolismo e le funzioni ghiandolari. Mostrano anche un effetto positivo sul sistema nervoso vegetativo.



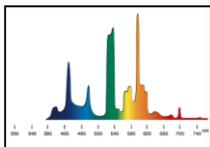
Distribuzione dell'energia spettrale della luce naturale.



Lampada fluorescente



Colore standard universale bianco



Tritoforo colore bianco ceramico

Disinfezione fotocatalitica (PCD) con biossido di titanio

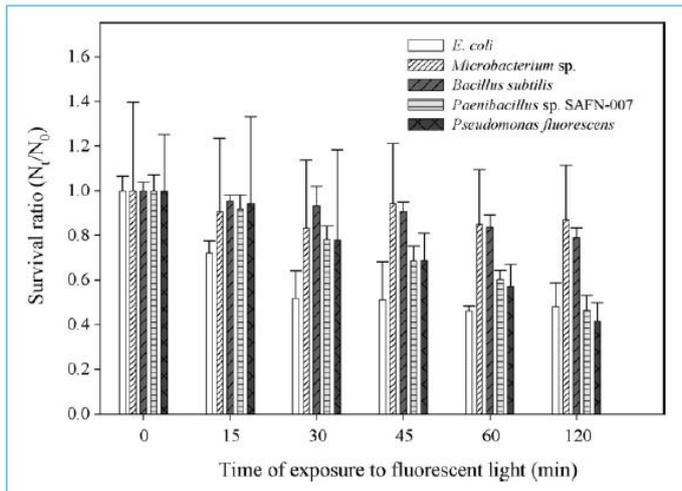


Figura 17 - Rapporti di sopravvivenza (N_t/N_0) in funzione della durata di esposizione (in assenza di TiO_2) per *E. coli* K-12, *P. fluorescens*, *Microbacterium sp.*, *Paenibacillus sp. SAFN-007* e *B. subtilis*. I dati mostrati in questa figura sono le medie di tre repliche. N_t è il numero di UFC dopo irradiazione per t min.; N_0 il numero di UFC a 0 min. (Pal & al., 2007).

Come detto in precedenza, l'inattivazione dei batteri da parte di TiO_2 irradiato con luce fluorescente presenta una cinetica di reazione del primo ordine. L'entità dell'inattivazione aumenta per tutti i batteri con l'aumentare dell'esposizione alla luce fluorescente. Tuttavia, i singoli batteri mostrano un andamento differente della costante di velocità di inattivazione all'aumentare della quantità di TiO_2 .

In Figura 18 è riportata l'inattivazione di *E. coli* K-12 a 0, 15, 30, 45, 60 e 120 min.

utilizzando una lampada fluorescente con intensità UV-A (365 nm) pari a $0,013 \text{ mW/cm}^2$ ($13 \mu \text{ W/cm}^2$), ossia a sei dosi UV-A (0 - 11,7 - 23,4 - 35,1 - 46,8 - 93,6 mJ/cm^2 , rispettivamente), in presenza di differenti quantità di TiO_2 . Un aumento della quantità di TiO_2 da 234 a 1.666 mg/m^2 migliora l'efficienza d'inattivazione di *E. coli* K-12. Con una quantità di 234 mg/m^2 TiO_2 , oltre il 98% di *E. coli* K-12 viene inattivato entro 60 min ($46,8 \text{ mJ/cm}^2$) di irradiazione fluorescente.

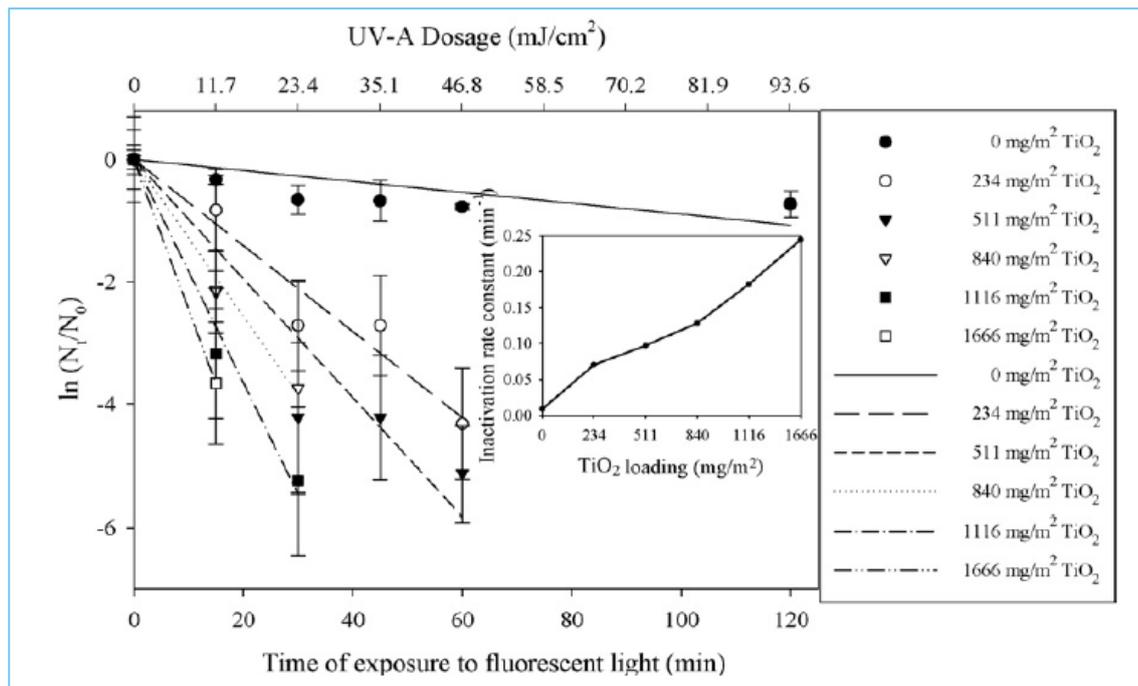


Figura 18 - Inattivazione fotocatalitica di *E. coli* K-12 in presenza di differenti quantità di TiO_2 . Ogni punto rappresenta la media di esperimenti triplicati (Pal & al., 2007).

Disinfezione fotocatalitica (PCD) con biossido di titanio

Quando la concentrazione di TiO_2 è superiore a 1.666 mg/m^2 , oltre il 96% dei batteri è inattivato entro 15 minuti di esposizione e tutti i batteri vengono inattivati dopo un' esposizione di 30 minuti. Questo è incoraggiante perché un'intensità UV-A di solo $0,013 \text{ mW/cm}^2$, disponibile nella irradiazione fluorescente, produce un'efficienza d'inattivazione paragonabile a quella ottenuta da Huang (Huang & al., 2000), che ha riscontrato un danneggiamento delle pareti delle cellule di *E. coli* in 20 minuti di esposizione a luce UV-A di $0,8 \text{ mW/cm}^2$ in presenza di TiO_2 .

Poiché un carico maggiore TiO_2 può aumentare la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in grado di reagire con le pareti cellulari, la membrana citoplasmatica ed altri componenti intracellulari, la velocità di inattivazione risultante aumenta in modo significativo. Questo è coerente con studi precedenti in cui è stata osservata una maggiore inattivazione di *E. coli* in mezzo acquoso quando venivano impiegate alte concentrazioni di TiO_2 in presenza di radiazioni UV-vis superiori a 380 nm (Wei & al., 1994) o sotto irraggiamento UV-A (Cho & al., 2004).

Tabella 13 - Costanti di velocità di inattivazione di *E. coli*, *Microbacterium sp.* e *B. subtilis* mediante fotocatalisi con sorgente UV-A e lampada fluorescente (Pal & al., 2007).

TiO_2 (mg/m^2)	Costanti (k) di primo ordine della velocità di inattivazione in min^{-1}					
	Inattivazione con lampada fluorescente ($0,013 \text{ mW/cm}^2$ di UV-A)			Inattivazione con sorgente UV-A ($4,28 \text{ mW/cm}^2$)		
	<i>E. coli</i> K-12	<i>B. subtilis</i>	<i>Microbacterium sp.</i>	<i>E. coli</i> K-12	<i>B. subtilis</i>	<i>Microbacterium sp.</i>
0	0,009	0,0022	0,005	0,175	0,1279	0,171
234	0,070	0,0027	0,027	0,180	0,1263	0,238
511	0,097	0,0032	0,031	0,243	0,1807	0,262
840	0,129	- ^a	0,018	0,290	0,1979	- ^b

^a Dati non disponibili

^b Errore sperimentale

La Tabella 13 evidenzia che, indipendentemente dalle sorgenti luminose impiegate, le costanti di velocità di inattivazione aumentano con l'aumentare della quantità di TiO_2 (fino a 840 mg/m^2), anche se alla lampada fluorescente (che ha una bassa intensità UV-A di $0,013 \text{ mW/cm}^2$) corrispondono costanti di velocità di inattivazione molto più piccole di quelle relative all'inattivazione con sorgente UV-A (che possiede un'intensità di $4,28 \text{ mW/cm}^2$). Questo era prevedibile in quanto l'intensità della sorgente UV-A era circa 330 volte superiore a quella disponibile nella lampada fluorescente. Sebbene *B. subtilis* e *Microbacterium sp.* siano più resistenti al trattamento fotocatalitico di *E. coli* K-12, entrambi sono risultati molto sensibili all'intensità UV-A più elevata (Tabella 13), e l'effetto è stato leggermente superiore in assenza di TiO_2 (carico di 0 mg/m^2). In presenza di TiO_2 , le velocità di inattivazione si sono rivelate superiori di un fattore 2,57-56, in particolare per i batteri Gram-positivi (*B. subtilis* e *Microbacterium sp.*). Questi risultati indicano due possibilità: (i) le reazioni dei radicali $\cdot\text{OH}$ e di altre specie reattive possono inattivare significativamente i batteri Gram-positivi rispetto ai danni dovuti all'eccitamento di molecole fotosensibili presenti all'interno delle cellule, (ii) lo

Disinfezione fotocatalitica (PCD) con biossido di titanio

0,013mW/m² di radiazione UV-A disponibile nella lampada fluorescente è sufficiente per eccitare la quantità TiO₂ utilizzato in questo studio.

In ulteriori lavori, è stato mostrato come l'inattivazione di *E. coli* aumenti con l'aumentare dell'intensità della radiazione incidente (Chen & al., 2009) (Benabbou & al., 2007) (Rincón & Pulgarín, 2003). Quando la quantità di fotoni aumenta, si generano più coppie elettrone-lacuna che portano alla formazione di più radicali •OH. D'altronde è stata riportata l'esistenza di una correlazione lineare tra l'inattivazione di *E.coli* e la concentrazione di •OH (Cho & al., 2004). Questa dipendenza lineare della velocità di reazione con il flusso fotonico è stata riscontrata solo a basse intensità di irradiazione, perché ad intensità elevate la concentrazione di portatori di carica è così grande che è maggiormente favorita la ricombinazione (una reazione di secondo ordine), che limita l'efficienza del processo (Vincze & Kemp, 1995) (Herrmann, 1999). Quando, invece, la radiazione incidente diminuisce, si osserva un ritardo iniziale più lungo. Ciò era nelle aspettative, considerando che il numero di danni cumulativi necessari per inattivare i batteri deve rimanere lo stesso: di conseguenza, se il numero di fotoni disponibili diminuisce (e, di conseguenza, la quantità di radicali •OH) è necessario un tempo di irradiazione maggiore per poter produrre un danno irreversibile.

6 Bibliografía

- Amezaga-Madrid, P., & al. (2002). Photoinduced bactericidal activity against *Pseudomonas aeruginosa* by TiO₂ based thin films. *FEMS Microbiol Lett*, 211(2), 183-188.
- Amezaga-Madrid, P., & al. (2003). TEM evidence of ultrastructural alteration on *Pseudomonas aeruginosa* by photocatalytic TiO₂ thin films. *J Photochem Photobiol B*, 70(1), 45-50.
- Ansari, S., & al. (1988). Rotavirus survival on human hands and transfer of infectious virus to inanimate and nonporous inanimate surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 1513-1518.
- Araña, J., & al. (2002). TiO₂-photocatalysis as a tertiary treatment of naturally treated wastewater. *Catal Today*, 76(2-4), 279-289.
- Armon, R., Laot, N., Narkis, N., & Neeman, I. (1998). Photocatalytic inactivation of different bacteria and bacteriophages in drinking water at different TiO₂ concentrations with or without exposure to O₂. *Adv Oxid Technol*, 3, 145-150.
- Armor, R., & al. (2004). Disinfection of *Bacillus* spp. spores in drinking water by TiO₂ photocatalysis as a model for *Bacillus anthracis*. *Waterborne Pathog*, 4(2), 7-14.
- Bai, S., & al. (2007). Characterization and antibacterial effect of a novel nanocomposite membrane. *Bioceramics 19 published in Key Eng Mater*, 330-332(I), 325-328.
- Barker, J., & al. (2004). Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of norovirus contamination via environmental surfaces. *J Hosp Infect*, 58, 42-49.
- Belhácová, L., & al. (1999). Inactivation of microorganisms in a flow-through photoreactor with an immobilized TiO₂ layer. *J Chem Technol Biotechnol*, 74(2), 149-154.
- Benabbou, A., & al. (2007). Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli*. Effect of concentration of TiO₂ and microorganism, nature and intensity of UV irradiation. *App. Cat. B: Environ.*, 76(3-4), 257-263.
- Bhalla, A., & al. (2004). Acquisition of nosocomial pathogens on hands after contact with environmental surfaces near hospitalized patients. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 25, 164-167.
- Blaschke-Hellmessen, R., & al. (1985). Umweltresistenz und natürliche Keimreservoir medizinsch bedeutsamer Sprosspilze. *Zeitschrift für die gesamte Hygiene*, 31, 712-715.
- Bolton, J. (2002). Fundamentals of ultraviolet light. *First Asia Regional Conference on Ultraviolet Technologies for Water, Wastewater & Environmental Applications*. Singapore.

Bibliografia

- Bonten, M., & al. (1996). Epidemiology of colonisation of patients and environment with vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*, 348, 1615–1619.
- Boyce, J., & al. (1997). Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: possible infection control implications. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 18, 622–627.
- Boyce, J., & al. (2008). Impact of hydrogen peroxide vapor room decontamination on *Clostridium difficile* environmental contamination and transmission in a healthcare setting. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 29, 723–729.
- Bures, S., & al. (2000). Computer keyboards and faucet handles as reservoirs of nosocomial pathogens in the intensive care unit. *American Journal of Infection Control*, 28, 465–471.
- Butz, A., & al. (1993). Prevalence of rotavirus on high-risk fomites in day-care facilities. *Pediatrics*, 92, 202–205.
- Caballero, L., & al. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* on immobilized TiO₂ using fluorescent light. *J Photochem Photobiol A*, 202(2-3), 92–98.
- Catalano, M., & al. (1999). Survival of *Acinetobacter baumannii* on bed rails during an outbreak and during sporadic cases. *Journal of Hospital Infection*, 42, 27–35.
- CDC. (1996). National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from October 1986 through April 1996, issued May 1996. *American Journal of Infection Control*, 24, 380–388.
- Chadwick, P., & al. (2000). Management of hospital outbreaks of gastro-enteritis due to small roundstructured viruses. *Journal of Hospital Infection*, 45, 1–10.
- Chen, F., & al. (2009). Antifungal capability of TiO₂ coated film on moist wood. *Build Environ*, 44(5), 1088–1093.
- Chen, F., & al. (2009). Correlation of photocatalytic bactericidal effect and organic matter degradation of TiO₂. Part I: Observation of phenomena. *Environ. Sci. & Tech.*, 43(4), 1180–1184.
- Chen, Y., & al. (2004). SARS in hospital emergency room. *Emerging Infectious Diseases*, 10, 782–788.
- Cheng, C., & al. (2009). The effects of the bacterial interaction with visible-light responsive titania photocatalyst on the bactericidal performance. *J Biomed Sci*, 16(7), 10.
- Cheng, Y., & al. (2007). Disinfection of *Legionella pneumophila* by photocatalytic oxidation. *Wat Res*, 41(4), 842–852.
- Cho, M., & al. (2004). Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection. *Wat Res*, 38(4), 1069–1077.

Bibliografia

- Cho, M., & al. (2005). Different inactivation behaviors of ms-2 phage and *Escherichia coli* in TiO₂ photocatalytic disinfection. *Appl Environ Microbiol*, 71(1), 270–275.
- Cho, M., & al. (2007a). Titanium dioxide/UV photocatalytic disinfection in fresh carrots. *J Food Prot*, 70(1), 97–101.
- Cho, M., & Yoon, J. (2008). Measurement of OH radical ct for inactivating *Cryptosporidium parvum* using photo/ferrioxalate and photo/TiO₂ systems. *J Appl Microbiol*, 104(3), 759–766.
- Choi, J., & al. (2007a). Photocatalytic antibacterial effect of TiO₂ film formed on Ti and TiAg exposed to *Lactobacillus acidophilus*. *J Biomed Mater Res B*, 80(2), 353–359.
- Chong, M., Jin, B., Chow, C., & Saint, C. (2010). Recent developments in photocatalytic water treatment technology: a review. *Wat Res*, 44(10), 2997–3027.
- Chun, M., & al. (2007). Surface modification of orthodontic wires with photocatalytic titanium oxide for its antiadherent and antibacterial properties. *Ang Orthodont*, 77(3), 483–488.
- Chung, C., & al. (2009). Inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* under various light sources on photocatalytic titanium dioxide thin film. *Surf Coat Technol*, 203(8), 1081–1085.
- Cohen-Yaniv, V., & al. (2008). Photocatalytic inactivation of *Flavobacterium* and *E. coli* in water by a continuous stirred tank reactor (CSTR) fed with suspended/immobilised TiO₂ medium. *Wat Sci Technol*, 58(1), 247–252.
- Cox, C. (1995). Chapter 6: Stability of airborne microbes and allergens. In C. Cox, & C. Wathes, *Bioaerosols Handbook*. Boca Raton, FL: CRC-Lewis Publishers.
- Cox, C., & Baldwin, F. (1967). The toxic effect of oxygen upon the aerosol survival of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*, 49, 115–117.
- Cushnie, T., & al. (2009). Variables to be considered when assessing the photocatalytic destruction of bacterial pathogens. *Chemosphere*, 74(10), 1374–1378.
- Dalrymple, O., & al. (2010). A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection. *Appl Catal B*, 98(1-2), 27–38.
- Dancer, S., & al. (2009). Measuring the effect of enhanced cleaning in a UK hospital: a prospective cross-over study. *BMC Med*, 7, 28.
- Ditta, I., & al. (2008). Photocatalytic antimicrobial activity of thin surface films of TiO₂, CuO and TiO₂/CuO dual layers on *Escherichia coli* and bacteriophage T4. *Appl Microbiol Biotechnol*, 79(1), 127–133.
- Duckro, A., & al. (2005). Transfer of vancomycin-resistant enterococci via health care worker hands. *Archives of Internal Medicine*, 165, 302–307.

Bibliografia

- Dunlop, P., & al. (2010). Inactivation of clinically relevant pathogens. *J Photochem Photobiol A*, 216, 303–310.
- Engelhart, S., & al. (2002). Pseudomonas aeruginosa outbreak in a haematology-oncology unit associated with contaminated surface cleaning equipment. *Journal of Hospital Infection*, 52, 93-98.
- Erdem, A., & al. (2006). Growth and some enzymatic responses of E. coli to photocatalytic TiO₂. *2006 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show - NSTI Nanotech 2006 Technical Proceedings*, (p. 588–591).
- Erkan, A., & al. (2006). Photocatalytic microbial inactivation over Pd doped SnO₂ and TiO₂ thin films. *J Photochem Photobiol A*, 184(3), 313–321.
- Feitz, A., & al. (2003). Kinetic modeling of TiO₂-catalyzed photodegradation of trace levels of microcystin-LR. *Environ Sci Technol*, 37(3), 561–568.
- Fierobe, L., & al. (2001). An outbreak of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii in critically ill surgical patients. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 22, 35-40.
- Fitzpatrick, F., & al. (2000). A purpose built MRSA cohort study. *Journal of Hospital Infection*, 46, 271-279.
- Gamage, J., & Zhang, Z. (2010). Applications of photocatalytic disinfection. *Int J Photoen 2010*, Article ID 764870, 11 pp.
- Gartner, M., & al. (2009). The simulation in the real conditions of antibacterial activity of TiO₂ (Fe) films with optimized morphology. *Nanostruct Mater Nanotechnol*, 29(8), 67–76.
- Gerrity, D., & al. (2008). Photocatalytic inactivation of viruses using titanium dioxide nanoparticles and low-pressure UV light. *J Environ Sci Health A*, 43(11), 1261–1270.
- Ghirardini, A., & al. (2012). *Manuale di formazione per il governo clinico: la sicurezza dei pazienti e degli operatori*. DIPARTIMENTO DELLA PROGRAMMAZIONE E DELL'ORDINAMENTO.
- Giannantonio, D., & al. (2009). Effects of concrete properties and nutrients on fungal colonization and fouling. *Int Biodeterior Biodegrad*, 63(3), 252–259.
- Gogniat, G., & al. (2006). The bactericidal effect of TiO₂ photocatalysis involves adsorption onto catalyst and the loss of membrane integrity. *FEMS Microbiol Lett*, 258(1), 18–24.
- Gogniat, G., & al. (2007). TiO₂ photocatalysis causes DNA damage via Fenton reaction-generated hydroxyl radicals during the recovery period. *Appl Environ Microbiol*, 73(23), 7740–7743.
- Greist, H., & al. (2002). Using scanning electron microscopy to visualize photocatalytic mineralization of airborne microorganisms. *Proceedings of the*

Bibliografia

- 9th International Conference on Indoor Air Quality and Climate*, (p. 712–717). Monterey, California.
- Guillard, C., & al. (2008). Microbiological disinfection of water and air by photocatalysis. *C R Chim*, 11(1-2), 107–113.
- Guimarães, J., & al. (2003). Photocatalytic inactivation of *Clostridium perfringens* and coliphages in water. *Braz J Chem Eng*, 20(4), 403–411.
- Gumy, D., & al. (2006a). Catalytic activity of commercial of TiO₂ powders for the abatement of the bacteria (*E. coli*) under solar simulated light: influence of the isoelectric point. *Appl Catal B*, 63, 76–84.
- Gumy, D., & al. (2006b). Solar photocatalysis for detoxification and disinfection of water: different types of suspended and fixed TiO₂ catalysts study. *Sol Energy*, 80(10), 1376–1381.
- Gwaltney, J., & Hendley, J. (1982). Transmission of experimental rhinovirus infection by contaminated surfaces. *American Journal of Epidemiology*, 116, 828–833.
- Han, W., & al. (2004). The inactivation effect of photocatalytic titanium apatite filter on SARS virus. *Prog Biochem Biophys*, 31(11), 982–985.
- Hanna, H., & al. (2000). Control of nosocomial *Clostridium difficile* transmission in bone marrow transplant patients. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 21, 226–228.
- Hardy, K., & al. (2006). A study of the relationship between environmental contamination with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and patients' acquisition of MRSA. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 27, 127–132.
- Harm, W. (1980). *Biological effects of ultraviolet radiation*. New York: Cambridge University Press.
- Hayden, M., & al. (2006). Reduction in acquisition of vancomycin-resistant enterococcus after enforcement of routine environmental cleaning measures. *Clin Infect Dis*, 42, 1552–1560.
- Hayden, M., & al. (2008). Risk of hand or glove contamination after contact with patients colonized with vancomycin-resistant enterococcus or the colonized patients' environment. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 29, 149–154.
- Herrmann, J. (1999). Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants. *Cat. Today*, 53(1), 115–129.
- Hirakawa, K., & al. (2004). Photo-irradiated titanium dioxide catalyzes site specific DNA damage via generation of hydrogen peroxide. *Free Radic Res*, 38(5), 439–447.
- Horie, Y., & al. (1996a). Effects of light intensity and titanium dioxide concentration on photocatalytic sterilization rates of microbial cells. *Ind Eng Chem Res*, 35(11), 3920–3926.

Bibliografia

- Hu, C., & al. (2007). Photocatalytic degradation of pathogenic bacteria with AgI/TiO₂ under visible light irradiation. *Langmuir*, 23(9), 4982–4987.
- Huang, Z., & al. (2000). Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis. *J Photochem Photobiol A*, 130(2-3), 163–170.
- Ibáñez, J., & al. (2003). Photocatalytic bactericidal effect of TiO₂ on *Enterobacter cloacae*. Comparative study with other Gram (-) bacteria. *J Photochem Photobiol A*, 157(1), 81–85.
- Ibanez, J., & al. (2003). Photocatalytic bactericidal effect of TiO₂ on *Enterobacter cloacae*: Comparative study with other Gram (-) bacteria. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 6283, 1-5.
- Imlay, J., & Fridovich, I. (1992). Suppression of oxidative envelope damage by pseudoreversion of a superoxide dismutase-deficient mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 174(3), 953–961.
- Ireland, J., & al. (1993). Inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation. *Appl Environ Microbiol*, 59(5), 1668–1670.
- Jacoby, W., & al. (1998). Mineralization of bacterial cell mass on a photocatalytic surface in air. *Environ Sci Technol*, 32(17), 2650-2653.
- Jiang, X., & al. (1998). Pathogen transmission in child care settings studied by using a cauliflower virus DNA as a surrogate marker. *J Infect Dis*, 177, 881–888.
- Kaatz, G., & al. (1988). Acquisition of *Clostridium difficile* from the hospital environment. *American Journal of Epidemiology*, 127, 1289-1294.
- Kambala, V., & al. (2009). Disinfection studies on TiO₂ thin films prepared by a sol-gel method. *J Biomed Nanotechnol*, 5(1), 121–129.
- Kangwansupamonkon, W., & al. (2009). Antibacterial effect of apatite-coated titanium dioxide. *Nanomed Nanotechnol Biol Med*, 5, 240-249.
- Kato, T., & al. (2005). Degradation of norovirus in sewage treatment water by photocatalytic ultraviolet disinfection. *Nippon Steel Tech Rep*, 92, 41–44.
- Khan, U., & al. (2010). UV and solar TiO₂ photocatalysis of brevetoxins (pbtxs). *Toxicon*, 55(5), 1008–1016.
- Kikuchi, Y., & al. (1997). Photocatalytic bactericidal effect of TiO₂ thin films: dynamic view of the active oxygen species responsible for the effect. *J Photochem Photobiol A*, 106(1-3), 51–56.
- Kim, B., & al. (2003). Bactericidal effect of TiO₂ photocatalyst on selected food-borne pathogenic bacteria. *Chemosphere*, 52(1), 277–281.
- Kim, S., & al. (2005). Inactivation of algal blooms in eutrophic water of drinking water supplies with the photocatalysis of TiO₂ thin film on hollow glass beads. *Wat Sci Technol*, 52(9), 145–152.

Bibliografia

- Kiwi, J., & al. (2004). New evidence for TiO₂ photocatalysis during bilayer lipid peroxidation. *J Phys Chem B*, 108(45), 17675–17684.
- Kiwi, J., & al. (2005). Evidence for the mechanism of photocatalytic degradation of the bacterial wall membrane at the TiO₂ interface by ATR-FTIR and laser kinetic spectroscopy. *Langmuir*, 21(10), 4631–4641.
- Kowalski, W. (2006). *Aerobiological Engineering Handbook*. McGraw-Hill Professional.
- Kozlova, E., & al. (2010). Inactivation and mineralization of aerosol deposited model pathogenic microorganisms over TiO₂ and Pt/TiO₂. *Environ Sci Technol*, 44(13), 5121–5126.
- Kramer, A., & al. (2006). How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? a systematic review. *BMC Infect Dis*, 6, 130.
- Kühn, K., & al. (2003). Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light. *Chemosphere*, 53(1), 71–77.
- Lee, S., & al. (1997). Photocatalytic inactivation of phage Q β By immobilized titanium dioxide mediated photocatalyst. *Wat Sci Technol*, 35, 101–106.
- Lemmen, S., & al. (2004). Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. *Journal of Hospital Infection*, 56, 191-197.
- Li, Y., & al. (2008). Inactivated properties of activated carbon-supported TiO₂ nanoparticles for bacteria and kinetic study. *J Environ Sci*, 20(12), 1527–1533.
- Lin, Z., & al. (2006). Inactivation efficiency of TiO₂ on H1N1 influenza virus. *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao Chem J Chin Univ*, 27(4), 721–725.
- Ling, M., & al. (2001). A nosocomial outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* originating from an intensive care unit. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 22, 48-49.
- Liu, H., & al. (2003). Photocatalytic inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus helveticus* by ZnO and TiO₂ activated with ultraviolet light. *Proc Biochem*, 39(4), 475–481.
- Liu, I., & al. (2005). The photocatalytic destruction of the cyanotoxin, nodularin using TiO₂. *Appl Catal B*, 60(3-4), 245–252.
- Lonnen, J., & al. (2005). Solar and photocatalytic disinfection of protozoan, fungal and bacterial microbes in drinking water. *Wat Res*, 39(5), 877-883.
- Mahamat, A., & al. (2007). Impact of infection control interventions and antibiotic use on hospital MRSA: a multivariate interrupted time-series analysis. *Int J Antimicrob Agents*, 30, 169–176.
- Maness, P., & al. (1999). Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Appl Environ Microbiol*, 65(9), 4094–4098.

Bibliografia

- Mangram, A., & al. (1999). Guideline for prevention of surgical site infection. *American Journal of Infection Control*, 27, 98-134.
- Manian, F., & al. (2010). Impact of an intensive terminal cleaning and disinfection (C/D) protocol involving selected hospital rooms on endemic nosocomial infection (NI) rates of common pathogens at a tertiary care medical center. *5th Decennial Meeting of the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA)*, (p. Abstract LB6). Atlanta.
- Martinez, J., & al. (2003). Role of environmental contamination as a risk factor for acquisition of vancomycin-resistant enterococci in patients treated in a medical intensive care unit. *Archives of Internal Medicine*, 163, 1905-1912.
- Marugan, J., & al. (2006). Analogies and differences between photocatalytic oxidation of chemicals and photocatalytic inactivation of microorganisms. *Wat Res*, 44(3), 789-796.
- Marugan, J., & al. (2008). Kinetics of the photocatalytic disinfection of *Escherichia coli* suspensions. *Appl Catal B*, 82(1-2), 27-36.
- Marugán, J., & al. (2010). Analogies and differences between photocatalytic oxidation of chemicals and photocatalytic inactivation of microorganisms. *Water Res*, 44, 789-796.
- Matsunaga, T., & al. (1988). Continuous-sterilization system that uses photoconductor powders. *Appl Environ Microbiol*, 54(6), 1330-1333.
- Mayfield, J., & al. (2000). Environmental control to reduce transmission of *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis*, 31, 995-1000.
- Mbithi, J., & al. (1992). Survival of hepatitis A virus on human hands and its transfer on contact with animate and inanimate surfaces. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 757-763.
- Miron, C., & al. (2005). Photoinduced bactericidal activity of TiO₂ thin films obtained by radiofrequency magnetron sputtering deposition. *J Optoelectron Adv Mater*, 7(2), 915-919.
- Miyagi, T., Kamei, M., Mitsuhashi, T., Ishigaki, T., & Yamazaki, A. (2004). Charge separation at the rutile/anatase interface: a dominant factor of photocatalytic activity. *Chem Phys Lett*, 390(4-6), 399-402.
- Mukhopadhyay, A., & al. (2004). SARS in a hospital visitor and her intensivist. *Journal of Hospital Infection*, 56, 249-250.
- Muszkat, L., & al. (2005). Solar photo-inactivation of phytopathogens by trace level hydrogen peroxide and titanium dioxide photocatalysis. *Phytoparasitica*, 33(3), 267-274.
- Nadtochenko, V., & al. (2005). Dynamics of *E. coli* membrane cell peroxidation during TiO₂ photocatalysis studied by ATR-FTIR spectroscopy and AFM microscopy. *J Photochem Photobiol A*, 169(2), 131-137.

Bibliografia

- Nadtochenko, V., & al. (2006). Laser kinetic spectroscopy of the interfacial charge transfer between membrane cell walls of *E. coli* and TiO₂. *J Photochem Photobiol A*, 181(2-3), 401–407.
- Nadtochenko, V., & al. (2008). Inactivation of pathogenic microorganisms in the photocatalytic process on nanosized TiO₂ crystals. *Russ J Phys Chem B*, 2(1), 105–114.
- Neely, A., & al. (2000). Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabric and plastic. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 724-726.
- Oguma, K., & al. (2002). Photoreactivation of *Escherichia coli* after low- or medium-pressure UV disinfection determined by an endonuclease sensitive site assay. *Appl Environ Microbiol*, 68, 6029–6035.
- Oka, Y., & al. (2008). Efficacy of titanium dioxide photocatalyst for inhibition of bacterial colonization on percutaneous implants. *J Biomed Mater Res B*, 86(2), 530–540.
- Otaki, M., & al. (2000). Aqueous microorganisms inactivation by photocatalytic reaction. *Wat Sci Technol*, 42(3-4), 103–108.
- Pal, A., & al. (2007). Photocatalytic inactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria using fluorescent light. *J Photochem Photobiol A*, 186(2-3), 335–341.
- Paspaltsis, I., Kotta, K., Lagoudaki, R., Grigoriadis, N., Poullos, I., & Sklaviadis, T. (2006). Titanium dioxide photocatalytic inactivation of prions. *J Gen Virol*, 87(10), 3125–3130.
- Passaretti, C., & al. (2008). Adherence to hydrogen peroxide vapor (HPV) decontamination reduces VRE acquisition in high-risk units. *48th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA)*, (p. Abstract K-4124b). Washington.
- Pratap Reddy, M., & al. (2008). Photocatalytic disinfection of *Escherichia coli* over titanium(IV) oxide supported on Zeolite. *Catal Lett*, 123(1-2), 56–64.
- Pryor, W. (1986). Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Ann Rev Physiol*, 48, 657–663.
- Rangel-Frausto, M., & al. (1994). An experimental model for study of *Candida* survival and transmission in human volunteers. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 13, 590-595.
- Ray, A., & al. (2002). Nosocomial transmission of vancomycin-resistant enterococci from surfaces. *JAMA*, 287, 1400–1401.
- Rheinbaben, F., & al. (2000). Transmission of viruses via contact in a household setting: experiments using bacteriophage straight phiX174 as a model virus. *J Hosp Infect*, 46, 61–66.

Bibliografía

- Rincón, A., & Pulgarín, C. (2003). Photocatalytical inactivation of *E. coli*: effect of (continuous-intermittent) light intensity and of (suspended-fixed) TiO₂ concentration. *App. Cat. B: Environ.*, 44(3), 263-284.
- Rüden, H., & al. (1997). Nosocomial and community-acquired infections in Germany. Summary of the results of the first national prevalence study (NIDEP). *Infection*, 25, 199-202.
- Rusin, P., & al. (2002). Comparative surface-to-hand and fingertip-to-mouth transfer efficiency of gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, and phage. *J Appl Microbiol*, 93, 585-592.
- Saito, T., & al. (1992). Mode of photocatalytic bactericidal action of powdered semiconductor TiO₂ on mutans streptococci. *J Photochem Photobiol B*, 14(4), 369-379.
- Salih, F., & al. (2002). Enhancement of solar inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation. *J Appl Microbiol*, 92(5), 920-926.
- Samore, M., & al. (1996). Clinical and molecular epidemiology of sporadic and clustered cases of nosocomial *Clostridium difficile* diarrhea. *Am J Med*, 100, 32-40.
- Sato, T., & Taya, M. (2006c). Copper-aided photo sterilization of microbial cells on TiO₂ film under irradiation from a white light fluorescent lamp. *Biochem Eng J*, 30(2), 199-204.
- Sawada, D., & al. (2005). Disinfection of some pathogens of mushroom cultivation by photocatalytic treatment. *Mycosci*, 46(1), 54-60.
- Scott, E., & Bloomfield, S. (1990). The survival and transfer of microbial contamination via cloths, hands and utensils. *Journal of Applied Bacteriology*, 68, 271-278.
- Senogles, P.-J., & al. (2001). Photocatalytic degradation of the cyanotoxin cylindrospermopsin, using titanium dioxide and UV irradiation. *Wat Res*, 35(5), 1245-1255.
- Shah, R., & al. (2008). The antibacterial effects of biphasic brookite-anatase titanium dioxide nanoparticles on multiple-drug-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Nanotechnol*, 4(3), 339-348.
- Sheel, D., & al. (2008). Biocidal silver and silver/titania composite films grown by chemical vapour deposition. *Int J Photoenergy*, Article ID 168185, 11 pp.
- Shen, X., & al. (2008). Visible light-induced plasmid DNA damage catalyzed a CdSe/ZnS-photosensitized nano-TiO₂ film. *Environ Sci Technol*, 42(14), 5049-5054.
- Shephard, G., & al. (1998). Photocatalytic degradation of cyanobacterial microcystin toxins in water. *Toxicon*, 36(12), 1895-1901.

Bibliografia

- Sherertz, R., & al. (2001). "Cloud" health care workers. *Emerging Infectious Diseases*, 7, 241-244.
- Shiraishi, F., & al. (1999). Photolytic and photocatalytic treatment of an aqueous solution containing microbial cells and organic compounds in an annularflow reactor. *Chem Eng Sci*, 54(10), 1547-1552.
- Singh, A., & al. (2005). Photocatalytic disinfection of water using immobilized titanium dioxide. *Poll Res*, 24(1), 29-33.
- Skorb, E., & al. (2008). Antibacterial activity of thin-film photocatalysts based on metal-modified TiO₂ and TiO₂:In₂O₃ nanocomposite. *Appl Catal B*, 84(1-2), 94-99.
- Sökmen, M., Candan, F., & Sümer, Z. (2001). Disinfection of E. coli by the Ag-TiO₂/UV system: lipidperoxidation. *J Photochem Photobiol A*, 143(2-3), 241-244.
- Song, S., & al. (2008). Fabrication of TiO₂ impregnated stainless steel fiber photocatalysts and evaluation of photocatalytic activity. *J Korean Ind Eng Chem*, 19(6), 674-679.
- Sun, D., & al. (2003). Photocatalytic degradation of E. coliform in water. *Wat Res*, 37(14), 3452-3462.
- Sunada, K., & al. (1998). Bactericidal and detoxification effects of TiO₂ thin film photocatalysts. *Environ Sci Technol*, 32(5), 726-728.
- Sunada, K., & al. (2003b). Studies on photokilling of bacteria on TiO₂ thin film. *J Photochem Photobiol A*, 156(1-3), 227-233.
- Suwalsky, M., & al. (2005). Evidence for the hydration effect at the semiconductor phospholipid-bilayer interface by TiO₂ photocatalysis. *J Photochem Photobiol B*, 78(3), 253-258.
- Tsuang, Y., & al. (2008). Studies of photokilling of bacteria using titanium dioxide nanoparticles. *Artific Organs*, 32(2), 67-174.
- Vacaroiu, C., & al. (2009). The effect of thermal treatment on antibacterial properties of nanostructured TiO₂ (N) films illuminated with visible light. *World J Microbiol Biotechnol*, 25(1), 27-31.
- Van Grieken, R., Marugan, J., Pablos, C., & Lopez, A. (2010). Comparison between the photocatalytic inactivation of Gram-positive E. phytopathogenic bacteria by dye-sensitized TiO₂ thin film activated by visible light. *Surf Coat Technol*, 202(4-7), 1329-1332.
- Verity, P., & al. (2001). Prospective evaluation of environmental contamination by *Clostridium difficile* in isolation side rooms. *Journal of Hospital Infection*, 49, 204-209.

Bibliografia

- Vincze, L., & Kemp, T. (1995). Light flux and light flux density dependence photomineralization rate of 2,4-dichlorophenol and acid in the presence of TiO₂. *J. of Photochem. and Photobiol. A: Chem.*, 87(3), 257-260.
- Vohra, A., & al. (2006). Enhanced photocatalytic disinfection of indoor air. *Appl Catal B*, 64(1-2), 57-65.
- von Rheinbaben, F., & al. (2000). Transmission of viruses via contact in a household setting: experiments using bacteriophage strain phiX174 as a model virus. *Journal of Hospital Infection*, 46, 61-66.
- Wamer, W., & al. (1997). Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide. *Free Radical Biol Med*, 23(6), 851-858.
- Wang, Y., & al. (2005). Disinfection and bactericidal effect using photocatalytic oxidation. *Trans Hong Kong Inst Eng*, 12(1), 39-43.
- Ward, R., & al. (1991). Prevention of surface-to-human transmission of rotaviruses by treatment with disinfectant spray. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 1991-1996.
- Watts, R., & al. (1995). Photocatalytic inactivation of coliform bacteria and viruses in secondary wastewater effluent. *Water Res*, 29(1), 95-100.
- Wei, C., & al. (1994). Bactericidal Activity of TiO₂ Photocatalyst in Aqueous Media: Toward a Solar-Assisted Water Disinfection System. *Environ. Sci. Technol.*, 28, 934-938.
- Wilcox, M., & al. (2003). Comparison of the effect of detergent versus hypochlorite cleaning on environmental contamination and incidence of *Clostridium difficile* infection. *J Hosp Infect*, 54, 109-114.
- Wilde, J., & al. (1992). Detection of rotaviruses in the day care environment by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *The Journal of Infectious*, 166, 507-511.
- Wolfrum, E., & al. (2002). Photocatalytic oxidation of bacteria, bacterial and fungal spores, and model biofilm components to carbon dioxide on titanium dioxide-coated surfaces. *Environ Sci Technol*, 36(15), 3412-3419.
- Yan, G., & al. (2009). Roles of H₂O₂ and OH· in bactericidal action of immobilised TiO₂ thin film reactor: an ESR study. *Photochem Photobiol A*, 207, 153-159.
- Yang, X., & al. (2008). Photocatalytic effect on plasmid DNA damage under different UV irradiation time. *Build Environ*, 42(3), 253-257.
- Yao, K., & al. (2007a). Photocatalytic disinfection of phytopathogenic visible light. *Surf Coat Technol*, 202(4-7), 1329-1332.
- Yao, K., & al. (2007c). Photocatalytic effects of TiO₂/Fe thin film irradiated with visible light on cellular surface ultrastructure and genomic DNA of bacteria. *Surf Coat Technol*, 201(15), 6882-6885.

Bibliografia

- Yu, K., & al. (2008). Removal of bioaerosols by the combination of a photocatalytic filter and negative air ions. *J Aerosol Sci*, 39(5), 377–392.
- Zan, L., & al. (2007). Photocatalysis effect of nanometer TiO₂ and TiO₂-coated ceramic plate on hepatitis B virus. *J Photochem Photobiol B*, 86(2), 165–169.