



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS-UFAL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE-ICBS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ARYANNA KELLY PINHEIRO SOUZA**

**MICROBIOTA FÚNGICA DO AMBIENTE DA UTI NEONATAL E DE  
AMOSTRAS CLÍNICAS DOS RECÉM-NASCIDOS INTERNADOS NO  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE MACEIÓ, AL**

**MACEIÓ/AL  
2009**

**ARYANNA KELLY PINHEIRO SOUZA**

**MICROBIOTA FÚNGICA DO AMBIENTE DA UTI NEONATAL E DE  
AMOSTRAS CLÍNICAS DOS RECÉM-NASCIDOS INTERNADOS NO  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE MACEIÓ, AL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientação: Prof<sup>o</sup>. Dr. **Eurípedes Alves da Silva Filho**

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. **Maria Anilda dos Santos Araújo**

**MACEIÓ/AL**

**2009**

**Catlogação na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale**

S729m Souza, AryannaKelly Pinheiro.

Microbiota fúngica do ambiente da UTI neonatal e de amostras clínicas dos recém-nascidos internados no Hospital Universitário de Maceió, Al / Aryanna Kelly Pinheiro Souza, 2009.

128 f. : il.

Orientador: Eurípedes Alves da Silva Filho.

Co-Orientadora: Maria Anilda dos Santos Araújo.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2009.

Bibliografia: f. 62-81.

Anexos: f. 82-128.

1. Infecção hospitalar. 2. Unidade de Tratamento Intensivo – Neonatal.  
3. Hospital Universitário de Maceió (AL). 4. Fungos. 5. Higiene hospitalar.  
I. Título

CDU: 616-053.31/.32



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

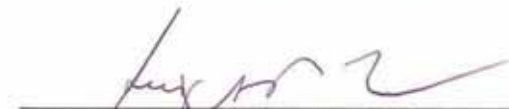
Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna Aryanna Kelly Pinheiro de Souza, intitulada: "Microbiota fúngica do ambiente da UTI neonatal e de amostras clínicas dos recém-nascidos internados no Hospital Universitário de Maceió, AL", orientada pelo Prof. Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 17 de julho de 2009.


Os membros da Banca Examinadora, consideraram a candidata APROVADA

**Banca Examinadora:**

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Oliane Maria Correia Magalhães (Titular)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Délia Maria de Moura Lima Herrmann - (Titular)  
Faculdade de Medicina - FAMED/UFAL

  
Prof. Dr. Luiz Antônio Ferreira da Silva - (Titular)  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - ICBS/UFAL

  
Prof. Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho - (Orientador)  
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde - ICBS/UFAL

## *Ofereço*

A Deus, por ter me deixado viver e desfrutar de tudo que me concedestes e por sempre iluminar os meus caminhos.

Aos meus pais, Maria Liege e Aluisio, por todas as oportunidades a mim concedidas, por me incentivarem e por serem exemplos de força e coragem em minha vida.

## *Dedico*

A minha avó Florací e as minhas tias Ana Maria, Maria do Carmo, que foram mães na ausência de minha mãe e que foram capazes de me educar da melhor maneira possível. E por serem as pessoas que mais me apóiam na minha caminhada, dizendo sempre “tudo vai dar certo se DEUS QUI SER!”

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Alagoas, através do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde pela oportunidade de cursar esta Pós-Graduação e aumentar meus conhecimentos;

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo durante a realização do Mestrado em Ciências Biológicas e da Saúde;

À coordenação de Pós-Graduação nas pessoas da Prof<sup>a</sup>. Dra. Salete Smaniotto e o Prof<sup>o</sup> Dr. Emiliano Barreto, pelos esforços e a vontade em atender em todos os momentos que precisei;

A Prof<sup>o</sup> Dr. Euripedes Alves da Silva Filho pela oportunidade de cursar o mestrado e pelas orientações concedidas a mim;

A minha “eterna” co-orientadora Maria Anilda dos Santos Araujo por ter me mostrado e ensinado o mundo dos fungos, por sempre acreditar em mim, pela amizade, pelo carinho e compreensão;

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Délia Maria de Moura Lima Hermann pelo envio das amostras clínicas dos recém-nascidos além da concessão do acesso a UTI neonatal do Hospital Universitário Prof<sup>o</sup>. Dr. Alberto Antunes e as pessoas do setor de limpeza pela colaboração na realização das coletas, como também a todos os funcionários que de forma direta ou indireta contribuíram na realização deste trabalho;

Ao Corpo Docente da Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pelos ensinamentos e incentivos concedidos durante o curso;

A todos os colegas de curso e em especial a Juliane Barreto, Juliana Lyra, Angela Dornelas, Adalberto Alves, Gabriela Muniz, Yolanda Cupertino e Benisio Filho por serem companheiros nas horas de aflição;

As minhas queridas amigas e companheiras de laboratório Krystianelly Patrícia Pedrosa Santa Rita e Marília Gracelídia dos Santos Barros pela sincera amizade, garra, força, companheirismo, pelos “puxões de orelha” e pelos conselhos valiosos além da grande ajuda e esforços concedidos a mim durante a realização deste trabalho;

E a todos que compõe o Laboratório de Genética de Microbiologia Aplicada-BIOGEM, que de maneira direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho o meu muito obrigado.



## SUMÁRIO

	PÁGINAS
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1 Biologia dos Fungos.....	16
2.2 Fungos Anemófilos.....	17
2.3 O Ambiente e as Infecções Hospitalares.....	18
2.4 Infecções Hospitalares em Recém-nascidos .....	21
2.5 Infecções Hospitalares Causadas por Fungos.....	22
2.6 Ambientes climatizados e os Aspectos Legais no Brasil.....	24
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	27
3.1 Objetivo Geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
4.1 Caracterização da Área de Estudo.....	28
4.2 Coletas das Amostras.....	29
4.2.1 Coletas das Amostras do Ar por sedimentação passiva.....	29
4.2.2 Coletas das amostras dos Filtros dos Condicionadores de Ar.....	30
4.3 Análise Quantitativa e Qualitativa das Colônias.....	30
4.4 Isolamento de Leveduras das Amostras Clínicas.....	30
4.5 Identificação dos Fungos Filamentosos.....	31
4.6 Identificação dos Fungos Leveduriformes Através da Técnica de PCR	31
4.6.1 Obtenção da massa celular e extração de DNA genômico.....	31
4.6.2 Amplificação com os iniciadores espécie-específicos.....	32
4.6.3 Amplificação da Região ITS do DNA ribossomal.....	34
4.8 Análise Estatística.....	34
<b>5. RESULTADOS</b> .....	35
5.1 Quantificação das UFC do Ar.....	35
5.2 Microbiota Fúngica do Ar.....	36
5.3 Microbiota Fúngica dos Filtros dos Condicionadores de Ar.....	40
5.4 Isolamento de Leveduras das Amostras Clínicas.....	41
5.5 Identificação de Espécies de Leveduras do Gênero <i>Candida</i> no Ambiente e nas Amostras Clínicas dos Recém-nascidos.....	42

5.6 Amplificação com os iniciadores espécie-específicos utilizados na identificação de leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	45
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	48
6.1 Quantificação das UFC do Ar.....	49
6.2 Microbiota Fúngica do Ar.....	48
6.3 Microbiota Fúngica dos Filtros dos Condicionadores de Ar.....	52
6.4 Isolamento de Leveduras nas Amostras Clínicas.....	54
6.5 Espécies de Leveduras do Gênero <i>Candida</i> no Ambiente e nas Amostras Clínicas dos Recém-nascidos.....	55
6.6 Amplificação com os iniciadores espécie-específicos utilizados na identificação de leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	57
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	60
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	61
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	62
<b>10. ANEXOS</b> .....	83
10.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	83
10.2 Resolução - RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003.....	84
<b>11. APÊNDICES</b> .....	100
11.1 Artigo a ser submetido.....	100
11.2 Aspectos Macroscópicos e Microscópicos dos Gêneros Identificados.....	127

## LISTA DE FIGURAS

	PÁGINAS
<b>FIGURA 1</b> - Ambientes A e B da UTI neonatal do Hospital Universitário Dr. Profº Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, as setas indicam os condicionadores de ar do tipo ACJ.	28
<b>FIGURA 2</b> - Locais de exposição das placas de Petri descartáveis contendo agar Sabouraud dextrose no interior dos dois ambientes das UTI neonatal do Hospital Universitário Profº. Dr. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, Maceió, AL.	29
<b>FIGURA 3</b> - Crescimento fúngico em placas de Petri contendo o meio agar Sabouraud dextrose acrescido de 50mg/L de cloranfenicol após incubação durante sete dias.	30
<b>FIGURA 4</b> - Distribuição total de unidades formadoras de colônias de fungos isolados antes e após a limpeza da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTI) do Hospital Universitário Profº. Dr. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, Maceió, AL.	35
<b>FIGURA 6</b> - Distribuição de unidades formadoras (média ± desvio padrão) de colônias isoladas dos dois ambientes A e B, antes e após a limpeza da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTI) do Hospital Universitário Profº. Dr. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, Maceió, AL.	36
<b>FIGURA 7</b> - Distribuição de UFC (média ± desvio-padrão) dos gêneros <i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Aspergillus</i> antes e após a limpeza dos dois ambientes (A e B) da UTI neonatal do Hospital Universitário Profº. Dr. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, Maceió, AL.	38
<b>FIGURA 8</b> - Distribuição UFC (média ± desvio-padrão) das espécies de <i>Cladosporium</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. e <i>Aspergillus</i> spp. durante as 20 coletas realizadas na UTI neonatal do Hospital Universitário Profº. Dr. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, Maceió, AL, no período de Abril de 2007 a Março de 2008.	39

- FIGURA 9** - Distribuição de UFC de fungos isolados dos filtros (A e B) dos condicionadores de ar dos dois ambientes da UTI neonatal do Hospital Universitário Prof<sup>o</sup>. Dr. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, Maceió, AL durante as 20 coletas realizadas no período de Abril de 2007 a Março de 2008. 40
- FIGURA 10** - Frequência das principais espécies de fungos isolados dos dois filtros dos condicionadores de ar dos dois ambientes da UTI neonatal do Hospital Universitário Prof<sup>o</sup> Dr. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, Maceió, AL. 41
- FIGURA 11** - Eletroforese em gel de agarose após PCR com os iniciadores espécie-específicos ilustrando os produtos da amplificação. Linhas de 1 a 12; M - Marcador de 100 pares de base (pb); Linha 1- *C. tropicalis* URM 5694 (357 pb); 2 - AM1; 3 - RN 1; 4 - *C. parapsilosis* URM 5583 (300 pb); 5 - AM 48; 6 - RN 3; 7 - *C. kruzei* URM 1059 (258 pb); 8 - AM 15; 9 - RN 1; 10 - *C. albicans* URM 5984 (273 pb); 11 - AM 9; 12 - RN 20. 45
- FIGURA 12** - Eletroforese em gel de agarose após PCR com os iniciadores ITS 1 e ITS 4 das amostras controles da micoteca URM e das amostras isoladas do ambiente da UTI neonatal. Linhas de 1 a 10; 1- *C. albicans* URM 5984 (550 pb); 2 - *C. glabrata* URM 5594 (550 pb); 3 - *C. kruzei* URM 1059 (500 pb); 4 - *C. tropicalis* URM 5694 (550 pb); 5 e 7 - *C. guilliermondii* URM 5563 (550 pb); 6 - *C. parapsilosis* URM 5583 (550 pb); M - Marcador de 100 pb; 8 - AM 26 (600 pb); 9 - AM 51(600 pb); 10 - AM 53 (600 pb). 46

## LISTA DE QUADRO E TABELAS

	PÁGINAS
<b>QUADRO 1:</b> Parâmetros referenciais de qualidade do ar de interiores em ambientes artificialmente climatizados de uso público e coletivo (BRASIL, 2003).	26
<b>TABELA 1</b> - Iniciadores espécie-específicos utilizados na identificação de seis espécies de leveduras patogênicas do gênero <i>Candida</i> utilizadas como controle positivo.	33
<b>TABELA 2</b> - Protocolo de reação para amplificação com os iniciadores espécie-específicos para seis espécies de leveduras patogênicas do gênero <i>Candida</i> .	33
<b>TABELA 3</b> - Protocolo de reação para amplificação da região ITS do rDNA com os iniciadores ITS1 e ITS4.	34
<b>TABELA 4</b> - Fungos anemófilos isolados dos dois ambientes (A e B), antes e após a limpeza da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTI) do Hospital Universitário Profº. Dr. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, Maceió, AL.	37
<b>TABELA 5</b> - Ocorrência de leveduras nas amostras clínicas de urina, LCR, ponta de cateter e sangue provenientes dos neonatos internados na UTI neonatal do Hospital Universitário Profº. Dr. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, Maceió, AL.	42
<b>TABELA 6</b> - Frequência das espécies de leveduras isoladas das amostras clínicas dos recém-nascidos e do ambiente da UTI neonatal do Hospital Universitário Profº. Dr. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, Maceió, AL.	43
<b>TABELA 7</b> - Frequência de leveduras isoladas antes e após a limpeza nos dois ambientes (A e B) da UTI neonatal do Hospital Universitário Profº. Dr. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL de Maceió, AL.	43
<b>TABELA 8</b> - Espécies de <i>Candida</i> e isoladas das amostras clínicas dos recém nascidos (RN) e dos ambientes (AM) A e B da UTI neonatal do Hospital Universitário Profº. Dr. Alberto Antunes HUPAA/UFAL de Maceió, AL.	44

## RESUMO

**Aryanna Kelly Pinheiro Souza**

Os fungos que são dispersos pelo ar atmosférico são denominados de fungos anemófilos e são importantes por causar patologias em pacientes imunocomprometidos. Com o objetivo de monitorar a microbiota fúngica do ar, dos filtros dos condicionadores de ar e das amostras clínicas dos recém-nascidos internados na UTI neonatal do Hospital Universitário de Maceió - AL foram realizadas coletas de amostras do ar através da técnica de exposição de placas de Petri contendo o meio ágar Sabouraud acrescido de antibiótico. O material sólido dos filtros dos condicionadores de ar foi coletado utilizando um swab esterilizado. E das amostras clínicas dos recém-nascidos foram realizados o exame direto e cultura. Para identificação dos fungos filamentosos foram comparadas as características macro e microscópicas e as leveduras foram identificados através da técnica de PCR. Entre as 400 exposições de placas realizadas foram isoladas 1029 UFC, sendo 675 (55,8%) UFC obtidas antes e 534 (44,2%) após a limpeza. Das 40 amostras analisadas dos filtros dos condicionadores de ar foram obtidas 303 UFC, sendo o fungo *Cladosporium cladosporioides* com maior frequência tanto no ar com 186 (15,4%) UFC como nos filtros dos condicionadores de ar com 77 (37,7%). Não foram isolados fungos filamentosos das amostras clínicas dos recém-nascidos. Entretanto as leveduras *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram obtidas tanto das amostras do ar como dos recém-nascidos com exceção de *C. guilliermondii* que foi isolada apenas das amostras do ar.

**Palavras-chave:** Fungos, Infecção hospitalar, UTI neonatal, Limpeza.

## ABSTRACT

**Aryanna Kelly Pinheiro Souza**

The fungi are being opportunistic, with wide distribution in nature, including the hospital environment, where it is frequent the presence of microorganisms that cause hospital infection, especially in immunocompromised patients. To identify and quantify the fungal microbiota in air, the filters of air-conditioners and samples of newborns from the neonatal ICU at University Hospital / HUPA, Maceió, Alagoas. Were held 20 exhibitions of collections totaling 400 disposable Petri dishes containing Sabouraud agar medium plus antibiotic. The plates were placed randomly inside and open the two neonatal ICUs (A and B) for 20 minutes. Also, there were 20 samples of the filters of air-conditioners of neonatal ICUs and conducted the direct examination and culture of clinical samples from newborns. CFU were isolated in 1209, these 675 (55.8%) were isolated CFU before cleaning to be done in the neonatal ICU and 534 (44.2%) CFU obtained after cleaning. Of 697 CFU of the environment of the NICU, 372 were isolated before and 325 after cleaning. Environment B, were obtained of 512 CFU and 303 CFU were obtained before cleaning and 209 after UFC. During the study species of *Cladosporium* was the most representative in the air and in the filters of air-conditioners. The clinical sample was more representative urine with 79.5%. Among the identified yeast *Candida parapsilosis* was present in 38.9% of environmental isolates of yeast and *Candida albicans* was isolated in 20% of clinical samples of newborns. The presence of pathogenic fungi in the two environments of the neonatal ICU and clinical samples of infants, demonstrating the need for constant monitoring to take control of microorganisms in hospital environments, especially in intensive care units where there is the presence of immunocompromised patients prone to develop fungal infections.

Keywords: Fungi, hospital infection, neonatal ICU, Cleaning.

## 1.0 INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos ubíquos encontrados em vegetais, animais, homem, detritos, água, ar e, em abundância no solo, sendo participantes ativos do ciclo da natureza. Sua dispersão é realizada por animais, homem, insetos, água e, principalmente pelo ar atmosférico através do vento e são chamados de fungos anemófilos (BERNARDI e NASCIMENTO, 2005).

Os fungos anemófilos podem ser causadores de micoses em humanos, animais, bem como doenças em plantas. A capacidade dos fungos em causar doença em humanos parece ser um fenômeno acidental, diagnosticado como infecção oportunista e estaria associada ao estado imunológico do indivíduo e sua exposição ambiental (WANKE et al., 2000).

Os ambientes climatizados são os espaços fisicamente determinados e caracterizados por dimensões e instalações próprios, submetidos ao processo de climatização através de equipamentos (ANVISA, 2003). Segundo Martins-Diniz et al. (2005), nesses ambientes o acúmulo de umidade e material orgânico em bandejas de condicionadores de ar pode torná-las poderosas fontes dispersoras de microrganismos.

As infecções hospitalares causadas por microrganismos representam uma das complicações mais frequentes que podem acometer o doente hospitalizado e por este motivo é grande a preocupação com a qualidade do ar interno climatizados de ambientes hospitalares, como as Unidades de Terapia Intensiva - UTIs (MORBIM e SALMITO, 2006).

Segundo a Portaria nº. 2.616/98 do Ministério da Saúde a infecção hospitalar (IH) é conceituada como aquela adquirida após a admissão do paciente e que se manifesta durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares (BRASIL, 1998). A incidência de infecções hospitalares (IHs) por fungos tem aumentado substancialmente nas últimas décadas acarretando altos índices de mortalidade que atingem até 60% dos óbitos por infecções hospitalares (HOTA, 2004).

Espécies do gênero *Candida* têm sido os agentes isolados com maior frequência, correspondendo a cerca de 80% das infecções fúngicas de



origem hospitalar, sendo a quarta causa de infecção da corrente sanguínea, conduzindo ao óbito em torno de 25 a 38% dos pacientes que desenvolvem candidemia (ST-GERMAING et al., 2001).

A sepse fúngica vem se tornando freqüente no período neonatal, principalmente entre os recém-nascidos (RN) de peso muito baixo ao nascer. A incidência é inversamente proporcional à idade gestacional e ao peso de nascimento, variando entre 10% e 28% nos menores de 1000g (BALEY e ELLIS, 2003)

E a ocorrência de fungos dispersos pelo ar vem sendo destacada em algumas pesquisas realizadas em diversos estados do Brasil. Dentre os quais podemos destacar os estudos relacionados ao isolamento desses fungos em unidade hospitalar do município de Araraquara, São Paulo (DINIZ et al., 2005), sensibilização em indivíduos atópicos no Rio Grande do Sul (MEZZARI et al., 2002), exposição alergênica e sintomas respiratórios em ambientes climatizados em São Paulo (GAUDENZ et al., 2004), análise de um acidente fúngico na Biblioteca Central de Manguinhos (STRAUZ, 2001), em um aeroporto do Rio de Janeiro (SILVEIRA, 2001) e em ambiente climatizado artificialmente antes e após a higienização no Estado de São Paulo (DUTRA, 2002).

A realização deste estudo deve-se ao potencial patogênico apresentado por muitos fungos considerado como oportunistas em pacientes imunocomprometidos e ao aumento progressivo das infecções fúngicas em ambientes hospitalares. Além da contaminação ambiental por fungos presentes no ar ser uma preocupação por causar infecção sistêmica em paciente internados em áreas críticas principalmente nas Unidades de Terapia Intensiva neonatal (UTI neonatal).

## 2.0- REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- Biologia dos Fungos

Os fungos incluem organismos unicelulares ou filamentosos que não formam tecidos verdadeiros (ALEXOPOULOS et al., 1996; LACAZ et al., 2002). O conjunto de filamentos que compõe a frutificação (talo) dos fungos é chamado de micélio, que é um sistema de filamentos geralmente muito ramificado, constituindo às vezes, corpos morfológicamente complexos. Ao microscópio óptico, as hifas são muito simples, notando-se seu contorno, representado pela parede celular, e o citoplasma, cujo conteúdo não pode ser identificado nas preparações rápidas. Podem ser cenocíticas ou septadas (celulares). As septadas podem apresentar, ao microscópio eletrônico, septo completo, com poro simples ou poro doliporo - com espessamento nas bordas (SIDRIN e ROCHA, 2004; GUERREIRO e SILVEIRA, 2003).

O micélio pode ser classificado em dois tipos de acordo com o arranjo das hifas: prosênquima e pseudoparênquima. O micélio do tipo prosênquima caracteriza-se por sua aparência distintamente filamentosa, enquanto no pseudoparênquima a estrutura filamentosa não pode ser reconhecida, isto é, lembra um parênquima (GUERREIRO e SILVEIRA, 2003).

Os fungos possuem pigmentos responsáveis pelas cores variadas que apresentam, mas nenhum é capaz de absorver energia para síntese de aminoácidos a partir de CO<sub>2</sub>. Assim, são heterotróficos, mas se nutrem por absorção, ao contrário dos animais que o fazem por ingestão. No processo de nutrição por absorção, enzimas (ligninases, celulasas, pectinases, etc.) são liberadas no meio onde os fungos se desenvolvem que é invariavelmente constituído por uma fonte de matéria orgânica, seja de natureza vegetal, animal ou mesmo de outros fungos. Estas enzimas decompõem as moléculas maiores em menores, que são absorvidas. A fonte de matéria orgânica pode ser morta, em decomposição, neste caso, os fungos são ditos sapróbios. Quando crescem em matéria viva são parasitas. Existe ainda, um terceiro grupo, os simbiontes. Os líquens são exemplos de associações simbióticas de fungos com algas, enquanto as micorrizas são exemplos de associações com raízes de plantas terrestres (KENDRICK, 2008).

Estes organismos estão presentes nos mais variados ambientes, tanto aquáticos (marinhos e de águas continentais) quanto nos ambientes terrestres. Esporos resistentes são muito comuns no ar, dispersando-se facilmente através deste meio. Uma placa de Petri, contendo meio de cultura esterilizado, torna-se contaminada por fungos com facilidade, se mantida aberta durante alguns segundos, o que comprova sua ocorrência e abundância no ar. Para se ter uma idéia da eficácia neste modo de dispersão, estudos demonstram que esporos de determinadas espécies se deslocam do México até o Canadá, atravessando, desta forma, quase toda a América do Norte (ALEXOPOULOS et al., 1996). Existem diversos outros tipos de mecanismos de dispersão que ainda são pouco compreendidos como, por exemplo, através de animais (RAVEN et al., 2007).

Numa recente estimativa feita pelo renomado micologista inglês David Hawksworth, a diversidade de fungos é de aproximadamente 1,5 milhões de espécies (HAWKSWORTH, 2001). O detalhe é que temos até o momento apenas cerca de 75.000 espécies catalogadas, o que representa apenas 5% de toda a diversidade estimada e ainda desconhecida. Hawksworth ainda chama a atenção para as florestas tropicais, que segundo ele, é onde se encontra a maioria das espécies ainda não descritas pela ciência.

## **2.2- Fungos Anemófilos**

Os fungos que são dispersos na natureza através do ar atmosférico, são denominados de fungos anemófilos e por oportunismo, podem provocar patologias no ser humano (JAWETS, 1998). As infecções de origem fúngica são chamadas de micoses e, geralmente, são de longa duração (crônica). São classificadas em: superficiais, cutâneas, subcutâneas ou sistêmicas e oportunistas (BURTON e ENGELKIRK, 2005). As micoses oportunistas são aquelas em que um patógeno geralmente inofensivo no seu hábitat normal torna-se patogênico em um hospedeiro que se encontra debilitado ou traumatizado (TORTORA et al., 2005).

Entre os fungos dispersos pelo ar atmosférico, os mais freqüentemente detectados em regiões do Brasil pertencem aos gêneros *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhodotorula*, *Aureobasidium*, *Candida*,

*Fusarium*, *Curvularia*, *Rhizopus*, *Helminthosporium* e *Trichoderma*. Esses fungos, de maneira geral, têm a sua frequência aumentada no Brasil, nos períodos de outono e inverno (LACAZ et al., 2002).

Diferentes investigações de campo sugerem que a distribuição fúngica, em termos de concentração e composições genéricas, varia entre as áreas geográficas, sendo também influenciadas por fatores ambientais sazonais e climáticos (PEI-CHIN et al., 2000a; HUANG et al., 2002).

Alguns estudos como os realizados por Pei-Chin et al. (2000b), mostram que a exposição a fungos do ar parece estar associada ao desenvolvimento de várias doenças respiratórias. Assim, muitas asma ditas “de clima” estão na dependência ou na relação íntima com a flora micótica do ar, existindo ainda outras patologias como aspergilose, pneumonite por hipersensibilidade, rinite e algumas reações tóxicas, como toxicoses sistêmicas aguda, além de micoses com graus variados de dificuldades de tratamento (REPONEN et al., 1996). Tais problemas culminam, por exemplo, com a ausência de estudantes à escola e profissionais ao trabalho, ou a baixa produtividade em hospitais e ambientes ocupacionais (LI e KUO, 1992).

Alguns fungos oportunistas como *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Candida* sp. e *Fusarium* sp. são responsáveis por doenças desde otite, micotoxicoses, infecções urinárias, onicomicoses, infecções oculares até fungemias. Fato este bastante preocupante à clínica médica, pois tais microrganismos estão dispersos abundantemente no ambiente (SIDRIM e ROCHA, 2004; GRUMACH, 2001).

### **2.3- O Ambiente e as Infecções Hospitalares**

Muitos estudos reconhecem o ar do ambiente como fontes de propagação de microrganismos. Embora a maioria das infecções hospitalares esteja relacionada aos métodos diagnósticos e terapêuticos (origem endógena), essas infecções podem ser vinculadas pelo ar e devem ser consideradas (PEREIRA et al., 2005).

A quantidade de matéria particulada (poeira), taxa de ventilação e ocupação, natureza e grau de atividade exercida pelas pessoas que ocupam um espaço físico são alguns determinantes do grau de contaminação do ar

interior (LUOMA e BATTERMAN, 2001). Considerando-se que a contaminação microbiológica do ar de ambientes internos tenha como fontes o meio externo e o próprio ambiente, a concentração de microrganismos no ar é bastante variada (BERNARDS et al., 1998). Entretanto, se um ou mais gêneros são encontrados em maiores concentrações no ambiente interno que as observadas no ambiente externo, a fonte de amplitude precisa ser identificada e eliminada (JENSEN e SCHAFER, 2009).

Recentemente, os ambientes hospitalares receberam atenção da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que promoveu a redação da Consulta Pública nº 109, de 11 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003c), que até o momento não foi oficializada. Este documento classificou os ambientes hospitalares em quatro níveis de ocorrência e eventos adversos à saúde e estabeleceu limites máximos para contagens totais de bactérias e fungos.

A determinação da composição e concentração de microrganismos do ar de áreas internas e/ou externas em áreas críticas de hospitais tem sido enfatizada como extremamente necessária (ALBERTI et al., 2001; DINIS et al., 2005). Os primeiros relatos sobre a importância do meio ambiente hospitalar como fonte de transmissão de agentes infecciosos foram associados à contaminação do ar com esporos de *Aspergillus* sp. (PANNUTI, 1997).

Investigações da ocorrência de fungos ambientais, em especial os que compõem a microbiota anemófila hospitalar habitualmente oportunista, são importantes para prevenção de doenças alérgicas, bem como de infecções hospitalares provocadas por esses potenciais patógenos ao homem (GRUMACH, 2001).

Dentre os ambientes hospitalares, as unidades de terapia intensiva (UTI) merecem destaque, pois os pacientes que ocupam esses ambientes apresentam maior risco de adquirir infecção hospitalar devido à severidade da doença de base, procedimentos invasivos a que são submetidos, antes e após admissão em UTI, como cateteres venosos centrais, cateterismo vesical, ventilação mecânica, tempo de internação prolongada, uso de antibióticos de amplo espectro, alta densidade populacional e a alta relação paciente-enfermeiro (GORBACH et al., 2003; ABRAMCZYK, 2006).

No Brasil, entre aproximadamente 5 e 15% dos pacientes hospitalizados e 25 a 35% dos pacientes admitidos em UTIs adquirem infecção

hospitalar, sendo ela a quarta causa de mortalidade no país e estima-se que nesse setor ocorram cerca de 25% de todas as infecções hospitalares (EGGIMANN e PITTER, 2001).

As infecções de origem hospitalar passaram a ser de grande importância nos últimos anos, pelo aumento progressivo e pelas elevadas taxas de morbidade e mortalidade (PFALLER, 1996; DE MORAES et al., 2000; COLOMBO et al., 2003). Muitas dessas infecções são de origem endógena, quando causadas pela própria microbiota residente do paciente e outras de origem exógena pelas mãos dos trabalhadores da área de saúde, infusos contaminados, biomateriais e fontes inanimadas ambientais (WENZEL, 1995).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC, 2008), estima que, somente no território norte-americano, a infecção hospitalar (HI) é responsável por 1,7 milhões de infecções e 99 mil mortes por ano, representando 4,5 milhões de dólares em excesso nas despesas em cuidados em saúde (MCGOWAN, 2001).

A problemática da IH no Brasil cresce a cada dia, considerando que o custo do tratamento dos clientes com IH é três vezes maior que o custo dos pacientes sem infecção. Mesmo com a legislação vigente no país, os índices de IH permanecem altos, 15,5%, o que corresponde a 1,18 episódios de infecção por pacientes internado com IH nos hospitais brasileiros. Além disso, considera-se mais um agravante, o fato das instituições de saúde pública possuírem a maior taxa de prevalência de IH no país, 18,4% (LEISER et al., 2007).

Um das principais causas apontadas para o grande número de pacientes acometidos por IH é a transmissão cruzada de patógenos (GARDAM et al., 2007). No entanto, outros fatores como enfermarias mal preparadas ou mal higienizadas, circulação constante de pessoas, utilização indiscriminada de antibióticos, além do uso de antissépticos impróprios nas mãos da equipe médica ou de enfermagem, também contribuem amplamente para o surgimento e a disseminação dessas infecções (SIQUEIRA, 2000; RAMPLING et al., 2001; BERQUÓ et al., 2004; HARAKEH et al., 2005).

Atualmente, os dados sobre infecção hospitalar são pouco divulgados no Brasil. Além disso, esses dados não são consolidados por muitos hospitais, o que dificulta o conhecimento da dimensão do problema no

país (TURRINI et al., 2002). Entretanto, estima-se que elas sejam responsáveis por cerca de 45.000 óbitos e prejuízos na ordem de bilhões de reais anualmente (MALUF et al., 2002).

#### **2.4- Infecções Hospitalares em Recém-Nascidos**

As infecções no período neonatal têm características que não são observadas em nenhum outro grupo de pacientes em diferentes períodos da vida. Pode-se considerar o recém-nascido (RN), a princípio, como microbiologicamente estéril, que irá adquirir a flora microbiana nas primeiras horas e nos dias iniciais de vida (HIRONAKA e CASANOVA, 2003; CALIL et al., 2006).

Considerando esse contexto, os Centers for Disease Control and Prevention (CDC), de Atlanta, Georgia, definiram como IH neonatais aquelas adquiridas durante o trabalho de parto ou durante a hospitalização, salvo quando as evidências indiquem aquisição transplacentária. No Brasil, de acordo com a Portaria nº 2.616/98, do Ministério da Saúde, as infecções nos neonatos são sempre consideradas hospitalares, com exceção das transmitidas por via transplacentária e aquelas associadas à rotura prematura de membrana por período superior às 24h (CALIL et al., 2006).

Tradicionalmente a infecção neonatal é classificada em: precoce – que se apresenta dentro das primeiras 72h de vida, relacionada à fatores de risco maternos e adquirida na passagem pelo canal vaginal, e tardia – que se apresenta após 72h de vida, adquirida no ambiente hospitalar (GOLDMANLN, 1981; HARRIS,1997).

A susceptibilidade a infecções é aumentada quando correlacionada com algumas deficiências do sistema imunológico e fragilidade das barreiras cutâneas e mucosas do neonato. Estas defesas são, ainda, mais fragilizadas no neonato com idade gestacional inferior a 37 semanas, baixo peso (até 2500g) e muito baixo peso (inferior a 1000g) (NAGATA et al., 2002; MACHADO e HILL, 2003; CARVALHO e GOMES, 2003; MARTINS e VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, 2004; ALMEIDA et al., 2005; FERRARI et al., 2006).

Durante a internação, o neonato é exposto a uma variedade de patógenos maternos e hospitalares que se tornam invasivos pelo estado imunológico deficiente. Estes fatores favorecem a disseminação de

microrganismos hospitalares e a colonização do prematuro por uma flora patogênica, aumentando os riscos de infecção hospitalar e óbitos nos neonatos (FLAHERTY e WEINSTEIN, 1996).

Há estimativas que infecções neonatais causem 1,6 milhões de mortes anuais ou 40% de todas as mortes neonatais em países em desenvolvimento (ZAIDI et al., 2005). Outras pesquisas realizadas por Nagata et al. (2002), no período de janeiro de 1999 a março de 2000, descreveram a incidência e as características clínicas da IH em neonatos. Os resultados mostram uma incidência de 50,6% de IH em neonatos internados em unidades de terapia intensiva (UTI neonatal) e uma taxa de mortalidade de 24,1% para neonatos que desenvolverão infecção.

Apesar dos avanços nas medidas preventivas e terapêuticas a Organização Mundial de Saúde estima que a taxa de IH em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) variam entre 5,9 a 32% (BANG et al., 2005). E no Brasil os óbitos relacionados diretamente com infecções hospitalares chegam à proporção de 40% (RAMOS, 2000)

Assim, a prevenção e controle das infecções hospitalares no período neonatal representam um desafio para todos aqueles envolvidos nos cuidados hospitalares aos recém-nascidos (GAY, 2007).

## **2.5 Infecções Hospitalares Causadas por Fungos**

As infecções hospitalares causadas por fungos têm-se constituído um problema crescente de saúde pública em muitos países. Por exemplo, nos Estados Unidos, a prevalência de infecções passou de 6% em 1980 para 10,4% em 1990, segundo o Sistema Nacional de Vigilância das Infecções Hospitalares, cerca de 80% destas infecções foram causadas por leveduras do gênero *Candida*, sendo a terceira causa de infecções mais comuns neste país (TRICK et al., 2002; MAROUFI et al., 2004; RODRIGUES et al., 2007; MALUCHE e SANTOS, 2008).

Vários processos patogênicos, fisiológicos ou traumáticos podem facilitar a colonização e posterior infecção do hospedeiro por *Candida* sp. Dentre estes, os mais comuns são imunossupressão por várias causas, neutropenia, desnutrição e a quimioterapia anti-neoplásica (JARVIS e MILLER, 2005; PFALLER e DIEKERNA, 2007). Outros facilitam a entrada do



microrganismo no hospedeiro, como o uso prolongado de catéteres, queimaduras e cirurgias extensas (VAZQUEZ et al., 1993; GODOY et al., 2003).

Porém, fatores combinados também podem ocorrer como a utilização prolongada de catéteres associados à antibioticoterapias, nos quais as leveduras podem se multiplicar no trato gastrointestinal ou pele. A partir daí, o fungo pode disseminar-se para corrente sanguínea, levando a um processo grave denominado candidemia (CANTÓN et al., 2001; COLOMBO e GUIMARÃES, 2003).

A Candidíase invasiva é definida como uma cultura positiva de *Candida* obtida a partir de um fluido corpóreo normalmente estéril, mas a fonte mais comum é o sangue, perfazendo aproximadamente 70% dos casos. Outras fontes incluem a urina e fluido cérebro-espinhal com aproximadamente 10% (SMITH, 2005).

A candidemia no período neonatal é uma condição muito grave, relacionada à elevada morbidade com cegueira, meningite, abscesso cerebral, endocardite fúngica e abscessos renais, especialmente nos recém-nascidos com muito baixo peso podendo levar a morte. A incidência é inversamente relacionada à idade gestacional e ao baixo peso, variando de 10% a 28% nas crianças que pesam menos do que 1.000g (MOREIRA, 2005).

Devido à crescente prevalência e ocorrência de leveduras do gênero *Candida* envolvidas em infecções hospitalares, salienta-se a necessidade de métodos simples e rápidos para identificação de leveduras clinicamente importantes no laboratório microbiológico (HSU et al., 2003; MALUCHE e SANTOS, 2008). Alguns testes de identificação rápida estão disponíveis no mercado, por exemplo, os meios cromogênicos como o CHRO-Magar<sup>®</sup>, que permitem a identificação presuntiva de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. kruzei*, com base nas características das cores das colônias produzidas no meio de cultura, assim como Albicans ID<sup>®</sup>, Choromalbicans Agar<sup>®</sup>, Bactiscard *Candida*<sup>®</sup> (CARDENES et al., 2004).

Outros testes comerciais se baseiam na assimilação de açúcares *in vitro*, dentre esses testes destacam-se o Vitek<sup>®</sup>, ID 32C<sup>®</sup>, Api 20C AUX9<sup>®</sup>, Auxacolor Yeast Star<sup>®</sup>, RapID Yeast Plus System<sup>®</sup> e Api *Candida*<sup>®</sup> 43.

Entretanto, estes testes comerciais podem apresentar erros na identificação (CAMPBELL et al., 1999; VERWEIJ et al., 1999).

Nesse sentido, a utilização de métodos moleculares de análises rápidas e de alta sensibilidade e especificidade que visam à identificação de sequências espécie-específicas têm gerado informações que implicam na maior eficácia na identificação de espécies comuns como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. kruzei* e *C. lusitaniae* (MCCULLOUGH et al., 1999; WAHYNINGSIH et al., 2000; MAHNSS et al., 2005).

## **2.6 Ambientes climatizados e os Aspectos Legais no Brasil**

A partir da década de 70 com o aumento progressivo do uso de sistemas de climatização em ambientes internos surgiram as primeiras reclamações referentes à saúde de seus ocupantes. A diminuição da umidade relativa do ar desencadeia ressecamento da pele e mucosas, especialmente do trato respiratório, bem como uma série de outros sinais e sintomas (AFONSO et al., 2006).

Assim, no início da década de 80, surgiu a expressão Síndrome do Edifício Doente (SED) referindo-se a relação de causa e efeito entre as condições ambientais observadas em áreas internas com redução da renovação do ar e os vários níveis de agressão aos seus ocupantes (STERLING et al., 1991)

Os fatores que podem levar a SED são, segundo Alexandre (1998), insuficiência de ar exterior, distribuição ineficiente do ar, controle imprópria de temperatura, projeto e modificações inadequadas após construção e falta de manutenção e higienização dos sistemas de climatização.

Estudos realizados por Addington (2004) revelam que a concentração de poluentes em ambientes internos poderia ser de duas a cinco vezes superior àquelas no ar externo. E a inadequada qualidade do ar em ambientes climatizados está também associada à perda da produtividade e abstenção no ambiente de trabalho, (JONES, 1999; SPENGLER et al., 2004).

A OMS contabilizou a contribuição de uma variedade de fatores de risco a doenças e determinou que a poluição do ar interno é o 8º fator de risco mais importante, sendo responsável por 2,7% dos casos de doenças no mundo (WHO, 2008).

No Brasil, após a morte do ministro Sergio Motta, ocorrida em 20 de agosto de 1998, provável vítima da SED (LOPES, 2004), surgiu à primeira norma para ambientes climatizados, não aplicável a estabelecimentos de saúde, a portaria nº. 3.523/GM, de 28 de agosto de 1998, que aprova a Regulamentação Técnica referente aos procedimentos de verificação de limpeza, remoção de sujidades por métodos físicos e manutenção do estado de integridade e eficiências de todos os componentes dos sistemas de climatização (BRASIL, 1998).

Este documento teve relevância também por determinar a formação posterior de um grupo de estudos, com o objetivo de elaborar um regulamento técnico com determinações sobre a avaliação da qualidade microbiológica do ar de ambientes climatizados, estabelecendo os métodos e parâmetros a serem adotados. Essa ação culminou com a redação da Resolução RE nº. 176, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde, de 24 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000d). Esta Resolução foi revisada em 2003, originando a resolução nº. 09, de 16 de janeiro de 2003 (BRASIL, 2003c).

A qualidade microbiológica do ar de ambientes internos é um marcador quantitativo e qualitativo utilizado como sentinela para determinar o grau de contaminação, principalmente em ambientes internos. O interesse dos estudos sobre a contaminação microbiológica do ar de ambientes hospitalares surgiu a partir da preocupação com os pacientes imunocomprometidos em adquirir infecções hospitalares (SIQUEIRA, 2000; KELKAR et al., 2005).

A maioria dos padrões e recomendações para microrganismos no ar de ambientes internos enfocam apenas fungos. Além disso, tais padrões e recomendações estão relacionados a doenças clinicamente definidas e abordam a amostragem, medidas corretivas e manutenção preventiva, sem estabelecer limites para as concentrações de bactérias no ar (OLESEN, 2004).

Na legislação em vigor é estabelecido que a contagem total máxima de fungos filamentosos e leveduriformes devem ser de 750 UFC/m<sup>3</sup> e que a relação da contagem de microrganismos no ar interior e no ar exterior do ambiente deve ser inferior ou igual a 1,5 (Relação interno/externo), valores muito elevados a relação I/E indicam a presença de fontes poluidoras no interior do ambiente e devem ser pesquisadas (BRASIL, 2003c).

Além dos parâmetros microbiológicos a legislação brasileira também estabelece parâmetros físico-químicos e estão resumidos no Quadro 1 (BRASIL, 1998e; BRASIL, 2000d; BRASIL, 2007a).

**QUADRO 1:** Parâmetros referenciais de qualidade do ar de interiores em ambientes artificialmente climatizados de uso público e coletivo (BRASIL, 2003c).

Parâmetros	Valores Máximos Permitidos
<b>Físico-Químicos</b>	
Dióxido de Carbono	≤1000ppm
Aerodispersóides	≤80 g/m <sup>3</sup>
Temperatura relativa: Verão	23 – 26°C
Inverno	20 – 22°C
Velocidade do ar	0,25 m/s
Umidade relativa: Verão	40 – 65%
Inverno	35 – 65%
Taxa de renovação	27 m <sup>3</sup> /h/pessoa
<b>Microbiológicos</b>	
Quantitativo para fungos filamentosos e leveduriformes	≤750 UFC/m <sup>3</sup>
Relação I/E*	≤1,5

\* Relação entre a quantidade de fungos no ar do ambiente interno (I) e no ar do ambiente externo ao prédio (E).

Fonte: NUNES, 2005

### 3.0 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Monitorar a microbiota fúngica do ar, dos filtros dos condicionadores de ar e das amostras clínicas provenientes dos recém-nascidos da UTI neonatal do Hospital Universitário Prof<sup>o</sup>. Dr. Alberto Antunes HUPAA/UFAL, Maceió, AL.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar os níveis de contaminação fúngica do ar dos ambientes A e B antes e após a realização da limpeza dos ambientes;
- ✓ Identificar os fungos isolados nos ambientes A e B antes e após a realização da limpeza;
- ✓ Indicar as espécies de fungos potencialmente patogênicas, toxicogênicas e alergizantes no ar e nos filtros nos condicionadores de ar dos ambientes A e B;
- ✓ Verificar possíveis variações temporais dos fungos isolados dos ambientes A e B;
- ✓ Avaliar a presença de leveduras do gênero *Candida* antes e após a limpeza e dos ambientes A e B nas amostras clínicas proveniente dos recém-nascidos internados na UTI neonatal.

## 4.0- MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1- Caracterização da Área de Estudo

O estudo foi realizado nos ambientes A e B da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (**Figura 1**), do Hospital Universitário Prof<sup>o</sup>. Dr. Alberto Antunes HUPAA-UFAL. Os dois ambientes possuem condicionadores de ar de 12 mil Btus e apresentam em média 14 leitos, sendo sete em cada ambiente da UTI Neonatal. Recebem os pacientes recém-nascidos que estão em estado crítico, necessitando de observação e de cuidados intensivos.

Nesse ambiente trabalham um médico pediatra diarista e dois residentes, uma enfermeira, duas auxiliares de enfermagem e um fisioterapeuta. As mães têm livre acesso à unidade sem tempo determinado. A limpeza terminal dos dois ambientes da UTI neonatal era realizada a cada quinze dias por dois profissionais de limpeza sendo o piso, paredes/divisórias, teto, porta/visores, luminárias, mobiliários e demais instalações limpos com hipoclorito de sódio.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Alagoas conforme o parecer nº 016604/2006-12 (**Anexo 1**).



**FIGURA 1** - Ambientes A e B da UTI neonatal do Hospital Universitário Prof<sup>o</sup>. Dr. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, as setas indicam os condicionadores de ar do tipo ACJ.

## 4.2 - COLETAS DAS AMOSTRAS

### 4.2.1 - Coletas das Amostras do Ar por sedimentação passiva

Quinzenalmente, durante o período de Abril de 2007 a Março de 2008, foram realizadas exposições de placas de Petri descartáveis contendo Agar Sabouraud Dextrose (ASD) adicionado de Cloranfenicol na concentração final de 50 mg/L em vários locais de acesso constante, nos dois ambientes estudados (**Figura 2**), totalizando 20 coletas e 400 amostras.



**FIGURA 2** - Locais de exposição das placas de Petri descartáveis contendo ágar Sabouraud dextrose no interior dos dois ambientes das UTI neonatal do Hospital Universitário Prof<sup>o</sup>. Dr. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL.

Em cada amostragem, foram utilizadas 20 placas de Petri de 90 mm de diâmetro, sendo dez placas expostas antes da limpeza e dez placas após a limpeza, divididas em cinco placas para cada ambiente da UTI Neonatal. Através da amostragem passiva, foram avaliados os bioaerossóis fúngicos que sedimentam sobre o meio de cultura, simulando, assim, a exposição de uma superfície a esses contaminantes (PASQUARELLA et al., 2000; SILVA FILHO e OLIVEIRA, 2007).

As placas foram abertas dentro dos dois ambientes durante 20 minutos, em altura de 1m e 20 cm, de acordo com Gambale et al. (1993). Após este período, as placas foram vedadas com fita adesiva e transportadas ao Laboratório de Genética e Microbiologia Aplicada - BIOGEN do Instituto de

Ciências Biológicas e da Saúde – ICBS e mantidas por um período de sete dias à temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ).

#### 4.2.2 - Coletas das amostras dos Filtros dos Condicionadores de Ar

As amostras dos filtros dos condicionadores de ar foram coletadas com swabs umedecidos em 5mL de água destilada esterilizada acrescido do antibiótico cloranfenicol, na concentração final de 50mg/L, contidas em tubos de ensaio e semeadas por espalhamento radial na superfície de ASD acrescido do mesmo antibiótico contido em placas de Petri.

#### 4.3 - Análise Quantitativa e Qualitativa das Colônias

Após constatação do crescimento fúngico nas placas, foi realizada uma análise quantitativa diferencial do número de UFC (Unidades Formadoras de Colônias), diferenciando em colônias de leveduras e fungos filamentosas (**Figura 3**). Na análise qualitativa, foi determinada a espécie fúngica.



**FIGURA 3** - Crescimento fúngico em placas de Petri contendo o meio ágar Sabouraud dextrose acrescido de 50mg/L de cloranfenicol após incubação durante sete dias.

#### 4.4 - Isolamento de Leveduras das Amostras Clínicas

Foram utilizadas as amostras clínicas: urina, ponta de cateter, líquido cefalorraquidiano e sangue, provenientes dos recém-nascidos internados na UTI neonatal do HUPAA/UFAL. Das amostras clínicas, foi realizado o exame direto, clarificado com hidróxido de potássio a 10% e/ou



contrastado com Nanquim e cultura, sendo as mesmas semeadas em cinco pontos equidistantes, em placas de Petri contendo ASD acrescido de antibiótico cloranfenicol, na concentração final de 50mg/L.

As amostras clínicas procedentes dos recém-nascidos foram coletadas pela própria equipe da UTI neonatal e encaminhadas ao laboratório de Análises Clínicas do HUPAA/UFAL, como de rotina.

#### **4.5- Identificação dos Fungos Filamentoso**

A identificação dos fungos filamentosos foi baseada na associação das características macroscópicas com os aspectos microscópicos da cultura. As características macroscópicas como textura, formato e coloração no verso e reverso da colônia juntamente com as características microscópicas como as estruturas reprodutivas e outras estruturas fúngicas como clamidosporos, hifas (presença ou ausência de septos), coloração da hifa e dos esporos (hialino ou demáceo), foram comparadas aos critérios adotados por Elewski (1992), Lacaz et al. (2002), Hoog et al. (2000) e Doctor fungi (2008). Após a identificação, os isolados foram preservados sob óleo mineral, segundo Sherf (1943).

#### **4.6- Identificação dos Fungos Leveduriformes Através da Técnica de PCR**

##### **4.6.1- Obtenção da massa celular e extração de DNA genômico**

Os isolados de leveduras foram inoculados em YPD líquido e incubados a 30°C por 16 horas a 150rpm em mesa agitadora termostabilizada. Após esse período, foi retirado 1,0mL da amostra e transferida para microtubos de 1,5mL esterilizados, e centrifugados a 5000rpm por três minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado 1,0mL de água destilada esterilizada e novamente centrifugado a 5000rpm por três minutos. Outra vez, o sobrenadante foi descartado e adicionado 600µL de solução de lise (2,0mL tris-HCl 1M pH 8,0, 0,5mL EDTA 0,5M pH 8,0, 1,0mL SDS 10%, 0,5mL NaCl 0,5M e água destilada esterilizada 6,0mL). Os microtubos foram mantidos a 65°C em banho-maria por 30 minutos com agitação por inversão a cada 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados igual volume de fenol/clorofórmio/álcool

isolamílico (24:24:1) e após breve agitação as suspensões foram centrifugadas a 12.000G por 10 minutos. Em seguida foram transferidos 500µL da fase superior para novos microtubos esterilizados de 1,5mL de capacidade e adicionados 500µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). As amostras foram centrifugadas novamente por igual período e rotação; logo após, 400µL da fase superior foram transferidos para novos microtubos esterilizados de 1,5mL de capacidade. A estes tubos foram adicionados 800µL de etanol absoluto gelado, permanecendo por 2 horas a -20°C para precipitação do DNA. Após a precipitação, o DNA foi descongelado e centrifugado a 12000rpm por 10 minutos, lavado com etanol a 70% por duas vezes, secado a temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ), em seguida ressuspendido em tampão tris/EDTA (TE) pH 8,0 (TRIS 10mM/EDTA 1mM) e mantido a -20°C. A quantificação foi realizada por espectrofotometria utilizando-se comprimento de onda de 260nm após diluição das amostras de 1:200. Para o cálculo da concentração de DNA foi utilizada a relação  $1 \text{ DO} = 50\mu\text{g/mL}$  (SILVA-FILHO,2003).

#### **4.6.2- Amplificação com os iniciadores espécie-específicos**

A reação de amplificação por PCR utilizando os iniciadores espécie-específicos descrita na Tabela 1 foi realizada em volume final de 20µL em termocicladores MJ - BIOCICLE de acordo com o protocolo descrito na Tabela 2. Os ciclos de amplificação foram programados para um ciclo de desnaturação inicial de 5 minutos a 96°C, seguido de 40 ciclos para desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos, com extensão final a 72°C por 15 minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,3% e submetido a uma tensão de 100 volts entre os eletrodos por 50 minutos em tampão TBE 0,5X. O gel foi corado com brometo de etídeo, visualizado em transiluminador e fotografado em sistema de fotodocumentação (DOC PRINT VILBER LOUMART). Como controle positivo para os iniciadores espécie-específicos foram utilizadas as leveduras da Coleção de Culturas – URM/UFPE *Candida albicans* URM5689; *C. parapsilosis* URM5583; *C. guilliermondii* URM5563; *C. glabrata* URM5594; *C. tropicalis* URM5694 e *C. kruzei* URM1059.

**TABELA 1** - Iniciadores espécie-específicos utilizados na identificação de seis espécies de leveduras patogênicas do gênero *Candida* utilizadas como controle positivo.

Espécies	Iniciadores	Sequência	Pb	Referências
		(5' → 3')		
<i>C. albicans</i>	CALB1	TTT ATC AAC TTG TCA CAC CAG A	≈273	LUO e MITCHELL, 2002
	CALB2	ATC CCG CCT TAC CAC TAC CG		
<i>C. glabrata</i>	CGL1	TTA TCA CAC GAC TCG ACA CT	≈423	LUO e MITCHELL, 2002
	CGL2	CCC ACA TAC TGA TAT GGC CTA CAA		
<i>C. parapsilosis</i>	CPA1	GCC AGA GAT TAA ACT AAC CA	≈300	HSU et al., 2003
	CPA2	CCT ATC CAT TAG TTT ATA CTC CGC		
<i>C. tropicalis</i>	CTR1	CAA TCC TAC CGC CAG AGG TTA T	≈357	LUO e MITCHELL, 2002
	CTR2	TGG CCA CTA GCA AAA TAA GCG T		
<i>C. guilliermondii</i>	CGU1	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	≈315	HSU et al., 2003
	CGU2	GTTTGG TTG TTG TAA GGC CGG G		
<i>C. kruzei</i>	CKRU	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	≈258	HSU et al., 2003
	CKRU2	AAA AGT CTA GTT CGC TCG GGC C		

**TABELA 2** - Protocolo de reação para amplificação com os iniciadores espécie-específicos para seis espécies de leveduras patogênicas do gênero *Candida*.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO	VOLUME NA	CONCENTRAÇÃO
	ESTOQUE	REAÇÃO (μL)	FINAL
Água destilada esterilizada		7,4	
Tampão PCR	10X	2,50	1X
BSA (Soro Albumina Bovina)	0,25μg/μL	2,50	0,025μg/μL
Mistura de dNTPs	2,0mM	2,50	0,2mM
Iniciador 1	12,5pmoles/μL	1,25	0,5pmoles/μL
Iniciador 2	12,5pmoles/μL	1,25	0,5pmoles/μL
MgCl <sub>2</sub>	50mM	1,50	3,0mmoles/μL
Taq Polimerase	5U/μL	0,10	0,05U/μL
DNA	50,0ng/μL	1,00	2,0ng/μL

#### 4.6.3- Amplificação da Região ITS do DNA ribossomal

A região ITS do DNA ribossomal foi amplificada por PCR em 25µL de volume final utilizando os iniciadores ITS1 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G3' e ITS4 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3' (WHITE et al., 1990), em termociclador MJ BIOCCLE, de acordo com o protocolo da **Tabela 3**. Os ciclos de amplificação foram programados para um ciclo de desnaturação inicial de 6 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos para desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 55°C por 20 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese e fotografados, nas mesmas condições do item anterior.

**TABELA 3** - Protocolo de reação para amplificação da região ITS do rDNA com os iniciadores ITS1 e ITS4.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO ESTOQUE	VOLUME NA REAÇÃO (µL)	CONCENTRAÇÃO FINAL
Água destilada esterilizada		12,6	
Tampão PCR	10X	2,5	1X
BSA (Soro Albumina Bovina)	0,25µg/µL	2,5	0,025µg/µL
Mistura de dNTPs	2,0mM	2,5	0,2mM
Iniciador ITS1	12,5pmoles/µL	1,0	0,5pmoles/µL
Iniciador ITS4	12,5pmoles/µL	1,0	0,5pmoles/µL
MgCl <sub>2</sub>	50mM	0,75	3,0mmoles/µL
Taq Polimerase	5U/µL	0,40	0,05U/µL
DNA	50,0ng/µL	1,00	2,0ng/µL

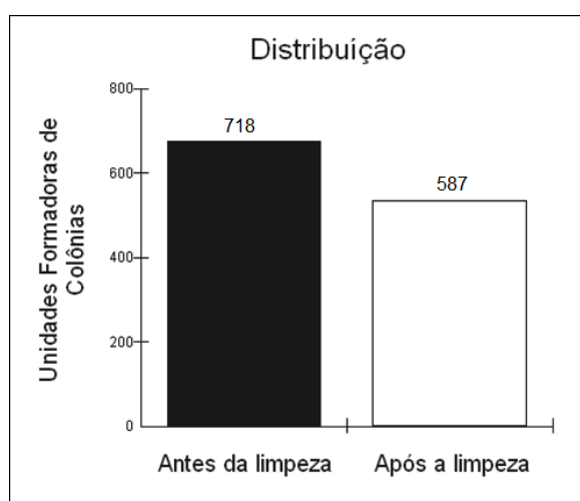
#### 4.7- Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o *software* Biostat 5.0<sup>®</sup> utilizando-se os testes Anova-Manova pareada, teste-t e teste-z aplicado para avaliar as variáveis antes e após a realização da higienização da UTI neonatal.

### 5.0 - RESULTADOS

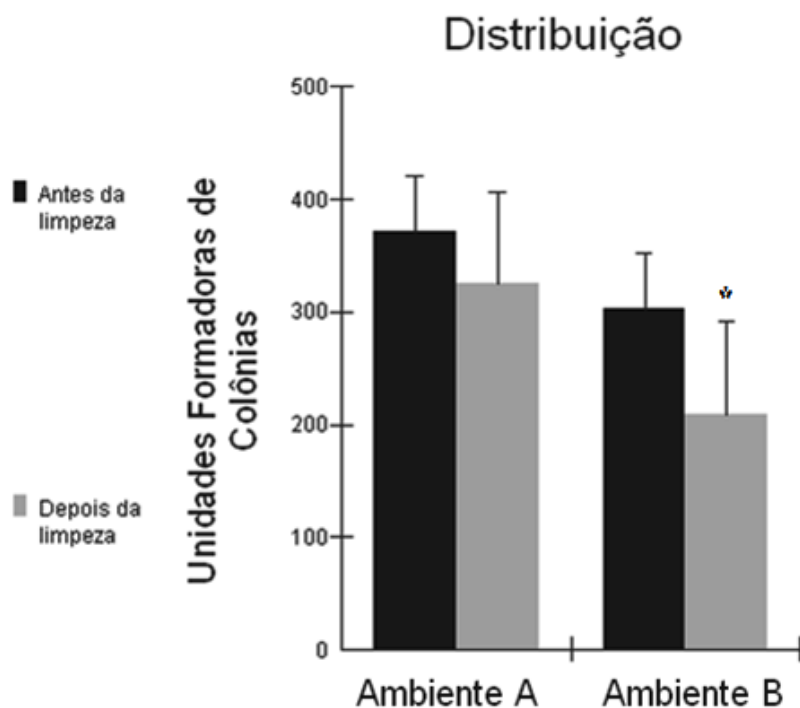
### 5.1 - Quantificação de UFC do Ar

A análise quantitativa das colônias permitiu observar a presença de 1305 unidades formadoras de colônias (UFC), destas, 718 (55,0%) UFC foram isoladas antes de ser realizada a limpeza da UTI neonatal e 587 (45,0%) UFC obtidas depois da limpeza (**Figura 5**). O valor médio de colônias encontradas em cada coleta, antes e após a limpeza foi  $8,23 \pm 11,19$  e  $7,39 \pm 10,34$  UFC, respectivamente.



**FIGURA 5** - Distribuição total de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de fungos isolados antes e após a limpeza da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTI) do Hospital Universitário Prof<sup>o</sup>. Dr. Alberto Antune-HUPAA/UFAL, Maceió, AL.

Foram isoladas 697 UFC no ambiente A da UTI neonatal, com valor médio de  $9,87 \pm 12,04$  UFC antes e  $7,93 \pm 12,95$  UFC depois da limpeza. Do ambiente B, foram obtidas 512 UFC com média de  $7,39 \pm 10,34$  UFC antes da limpeza e  $5,10 \pm 7,96$  depois (**Figura 6**).



**FIGURA 6** - Distribuição de UFC (média  $\pm$  desvio padrão) de colônias isoladas dos dois ambientes A e B, antes e após a limpeza da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTI) do Hospital Universitário Prof<sup>o</sup>. Dr. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, Maceió, AL.

## 5.2 - Microbiota Fúngica do Ar

Durante a realização deste estudo foram identificados 24 gêneros de fungos anemófilos e 42 espécies de fungos segundo o sistema de classificação de Alexopoulos et al. (1996) onde está representada a classe dos Deuteromycetes, subclasse Hyphomycetidae, incluindo duas famílias (Moniliaceae e Dematiaceae) como podemos observar na Tabela 4.

Entre os gêneros isolados, *Cladosporium* foi o mais frequente com 324 (26,8%) UFC, seguido pelos gêneros *Penicillium* com 300 UFC (24,8%), *Aspergillus* com 257 (21,3%) entre outros gêneros com frequências inferiores a 4,7% do total de colônias isoladas. A espécie *C. cladosporioides* obteve 186 (15,4%) UFC, seguido por *P. aurantiogriseum* com 132 (10,9%) UFC e *A. oryzae* com 113 (9,3%) UFC. De acordo com Hoog et al. 2000, podemos inferir que 27 (65,8%) são considerados patogênicos, 9 (21,9%) não patogênicos, 4 (9,8%) alergizante e 1 (2,5%) toxicogênicos (**Tabela 4**).

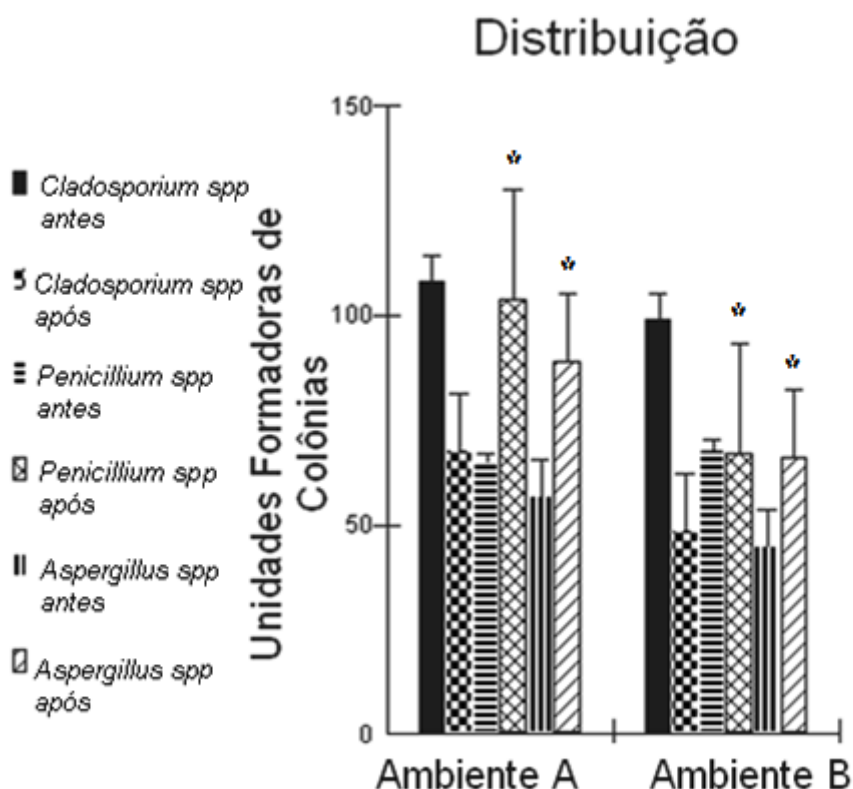
**TABELA 4** - Fungos anemófilos isolados dos dois ambientes (A e B), antes e após a limpeza da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTI) do Hospital Universitário Prof<sup>o</sup>. Dr. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, Maceió, AL.

Espécies	UTI NEONATAL AMBIENTE A				UTI NEONATAL AMBIENTE B				TOTAL
	Antes Limpeza		Após Limpeza		Antes Limpeza		Após Limpeza		
	UFC	%	UFC	%	UFC	%	UFC	%	
<i>Aspergillus fumigatus</i> <sup>P; A</sup>	8	19,5	15	36,6	8	19,5	10	24,4	41
<i>A. nidulans</i> <sup>P</sup>	7	29,2	10	41,7	4	16,6	3	12,5	24
<i>A. niger</i> <sup>P</sup>	11	18,3	19	31,6	12	20,1	18	30,0	60
<i>A. ustus</i> <sup>P</sup>	5	26,3	7	36,8	5	26,4	2	10,5	19
<i>A. oryzae</i> <sup>P; A</sup>	26	23,0	38	33,6	16	14,2	33	29,2	113
<i>Acremonium kiliense</i> <sup>P</sup>	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5
<i>Alternaria alternata</i> <sup>P</sup>	8	80	2	20	-	-	-	-	10
<i>Aureobasidium pullulans</i> <sup>P</sup>	11	22,0	9	18,0	22	44,0	8	16,0	50
<i>Bipolaris spicifera</i> <sup>P</sup>	2	100,0	-	-	-	-	-	-	2
<i>B. hawaiiensis</i> <sup>P</sup>	2	66,7	1	33,3	-	-	-	-	3
<i>Candida albicans</i> <sup>P</sup>	4	57,1	1	14,3	2	28,6	-	-	7
<i>C. guilliermondii</i> <sup>P</sup>	5	45,4	2	18,2	3	27,3	1	9,1	11
<i>C. parapsilosis</i> <sup>P</sup>	12	34,3	8	22,8	10	28,6	5	14,3	35
<i>C. tropicalis</i> <sup>P</sup>	3	100,0	-	-	-	-	-	-	3
<i>Chaetomium globosum</i> <sup>P; A</sup>	4	57,1	-	-	3	42,9	-	-	7
<i>Cladosporium cladosporioides</i> <sup>NP</sup>	64	34,4	52	27,9	48	25,8	22	11,8	186
<i>C. herbarum</i> <sup>P</sup>	18	56,2	5	15,6	9	28,1	-	-	32
<i>C. oxysporum</i> <sup>P</sup>	2	16,7	-	-	6	50	4	33,3	12
<i>C. sphaerospermum</i> <sup>P</sup>	24	25,5	11	11,7	36	38,3	23	24,4	94
<i>Curvularia giniculata</i> <sup>P</sup>	-	-	-	-	5	62,5	3	37,5	8
<i>C. lunata</i> <sup>P</sup>	4	66,7	2	33,3	-	-	-	-	6
<i>C. clavata</i> <sup>P</sup>	5	41,7	3	25,0	4	33,3	-	-	12
<i>Fusarium incarnatum</i> <sup>P</sup>	3	75,0	-	-	1	25,0	-	-	4
<i>F. subglutinans</i> <sup>P</sup>	2	66,7	1	33,3	-	-	-	-	3
<i>Geotrichum candidum</i> <sup>P; T</sup>	19	57,5	9	27,2	4	12,2	1	3,1	33
<i>Gliocladium roseum</i> <sup>NP</sup>	6	66,7	2	22,3	1	11,0	-	-	9
<i>Hortaea werneckii</i> <sup>P</sup>	1	100,0	-	-	-	-	-	-	1
<i>Monilia sitophila</i> <sup>NP</sup>	16	30,2	12	22,6	17	32,1	8	15,1	53
<i>Mycelia sterilia</i> <sup>NP</sup>	23	40,3	15	26,3	14	24,5	5	8,9	57
<i>Nigrospora sphaerica</i> <sup>NP</sup>	-	-	-	-	1	100,0	-	-	1
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> <sup>NP</sup>	38	28,8	56	42,4	17	12,9	21	15,9	132
<i>P. chysogenum</i> <sup>P</sup>	7	19,5	12	33,3	7	19,4	10	27,8	36
<i>P. citrinum</i> <sup>P</sup>	1	8,3	5	41,7	2	16,6	4	33,4	12
<i>P. decubens</i> <sup>P</sup>	-	-	-	-	5	62,5	3	37,5	8
<i>P. expansum</i> <sup>P</sup>	10	14,7	16	23,5	28	41,2	14	20,6	68
<i>P. purpurogenum</i> <sup>P; A</sup>	4	25	6	37,5	4	25	6	37,5	16
<i>P. verruculosum</i> <sup>NP</sup>	5	17,8	9	32,1	5	17,8	9	32,1	28
<i>Rhinocladiella aquaspersa</i> <sup>P</sup>	3	37,5	1	12,5	4	50,0	-	-	8
<i>Rhizopus ozygosporus</i> <sup>P</sup>	5	41,7	4	33,4	2	16,6	1	8,3	12
<i>Rhodotorula minuta</i> <sup>P</sup>	3	75,0	-	-	1	25,0	-	-	4
<i>R. mucilaginoso</i> <sup>P</sup>	4	66,7	-	-	2	33,3	-	-	6
<i>Stachybotrys chartarum</i> <sup>P</sup>	4	80,0	-	-	1	20,0	-	-	5
<i>Syctalidium lignicola</i> <sup>P</sup>	2	100,0	-	-	-	-	-	-	2
<i>Syncephalastrum racemosum</i> <sup>NP</sup>	3	37,5	1	12,5	4	50,0	-	-	8
<i>Verticillium chlamyosporium</i> <sup>NP</sup>	7	46,7	2	13,2	5	33,4	1	6,7	15
<b>TOTAL</b>	<b>400</b>	<b>30,6</b>	<b>372</b>	<b>28,5</b>	<b>318</b>	<b>24,4</b>	<b>215</b>	<b>16,5</b>	<b>1305</b>

P: Patogênico; T: Toxicogênico; A: Alergizante; NP: Não Patogênica

Na Figura 7, pode-se verificar a distribuição dos três principais gêneros isolados tanto antes quanto após a limpeza dos dois ambientes da UTI-neonatal, *Cladosporium* obteve 108 (33,4%) UFC e 68 (20,9%) UFC, *Penicillium* 65 (21,7%) UFC e 104 (34,6%) UFC, *Aspergillus* 57 (22,2%) UFC e 89 (34,6%) UFC, respectivamente, antes e após a limpeza do ambiente A.

No ambiente B foram isoladas 99 (30,6%) UFC do gênero *Cladosporium* antes e 49 (15,1%) UFC após a limpeza. *Pencillium* obteve 68 (22,6%) UFC antes e 67 (22,4%) UFC após a limpeza. Do gênero *Aspergillus* foi verificado o isolamento de 45 (17,5%) UFC antes e 66 (25,7%) UFC após a limpeza.

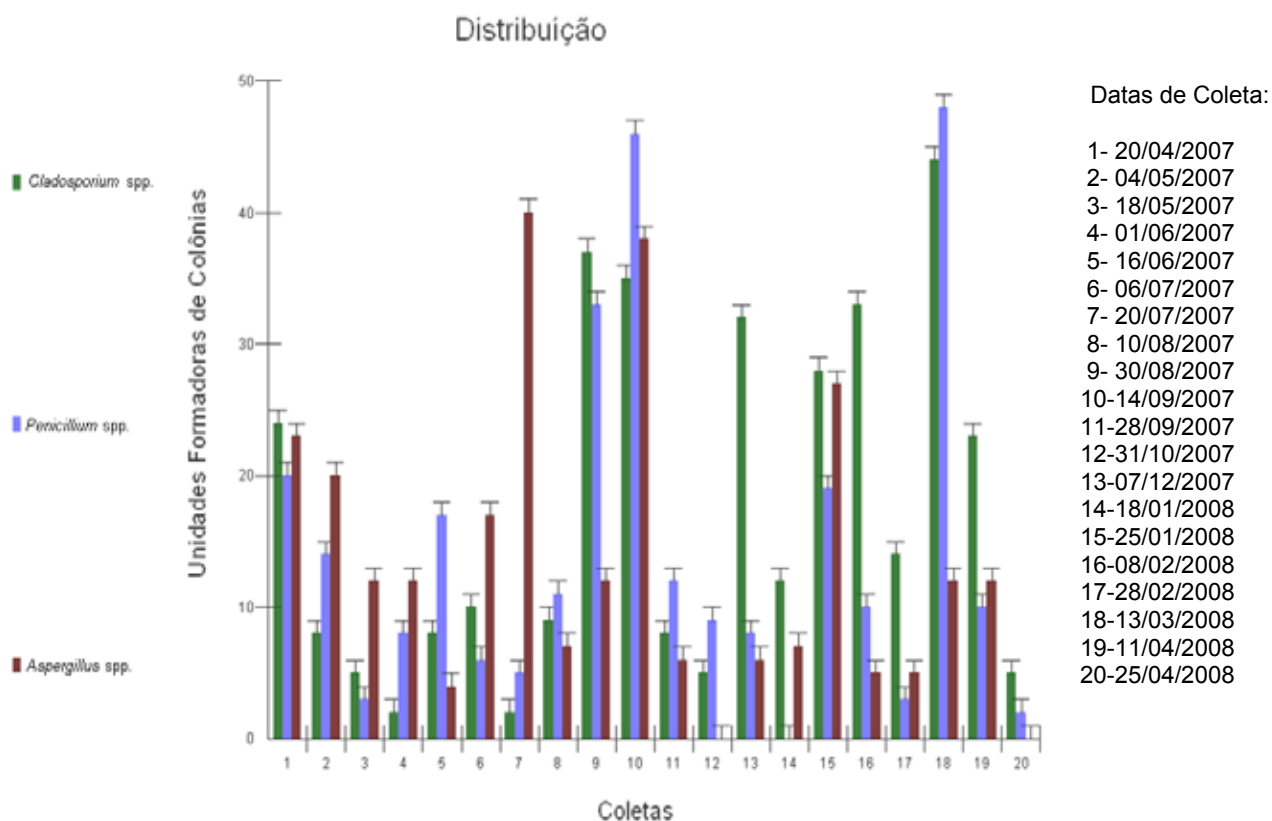


**FIGURA 7** - Distribuição de UFC (média  $\pm$  desvio-padrão) dos gêneros *Cladosporium*, *Penicillium* e *Aspergillus* antes e após a limpeza dos dois ambientes (A e B) da UTI neonatal do Hospital Universitário Prof<sup>o</sup>. Dr. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, Maceió, AL.



A Figura 8 mostra a distribuição de UFC durante as 20 coletas realizadas no período de Abril de 2007 a Março de 2008. Dentre os fungos observados com maior frequência, *Cladosporium* spp. esteve presente em todas as coletas e sua distribuição foi maior entre o período de julho a março.

As espécies de *Cladosporium* e *Penicillium* foram verificadas com distribuição superior a 30 UFC nos meses de agosto/2007 e abril/2008. *Aspergillus* spp. obtiveram o aumento da sua distribuição nos meses de julho e agosto de 2007. No entanto, espécies de *Aspergillus* não foram isoladas na coleta n° 12 em outubro de 2007 e na coleta n° 20 em abril de 2008, e *Penicillium* spp. esteve presente em todas as coletas exceto na coleta n° 14 em janeiro de 2008.



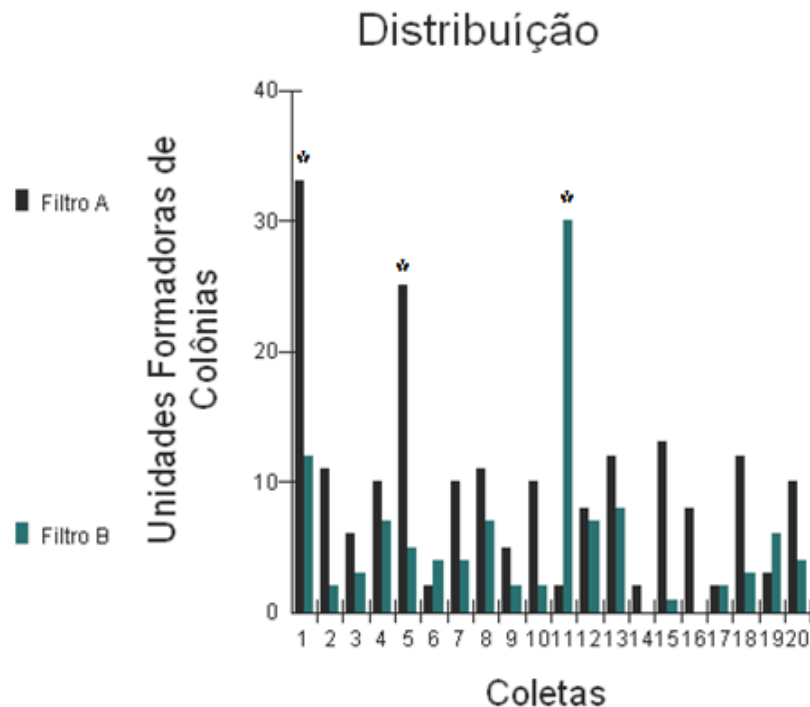
**FIGURA 8** - Distribuição UFC (média  $\pm$  desvio-padrão) das espécies de *Cladosporium* spp. *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. durante as 20 coletas realizadas na UTI neonatal do Hospital Universitário Prof<sup>o</sup>. Dr. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, Maceió, AL, no período de Abril de 2007 a Março de 2008.

### 5.3 – Microbiota fúngica dos Filtros dos Condicionadores de Ar

Das 40 amostras analisadas foram obtidas 303 UFC, sendo 194 (64,1%) UFC obtidas no filtro do condicionador de ar do ambiente A e 109 (35,9%) do filtro do condicionador de ar do ambiente B. A Figura 9 apresenta a distribuição de UFC de fungos isolados dos dois filtros dos condicionadores de ar durante as 20 coletas realizadas nos ambientes A e B da UTI neonatal.

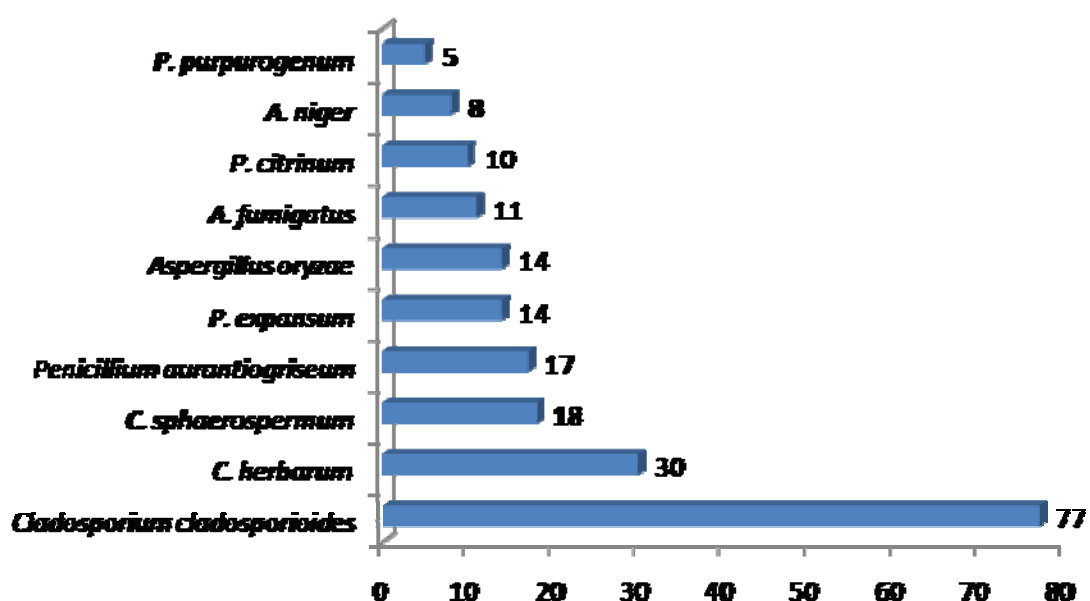
Nesta figura pode-se observar que o percentual de colônias de fungos manteve-se sempre elevado no filtro do condicionador de ar do ambiente A, exceto na 11ª coleta no qual o filtro do ar condicionado do ambiente B obteve 30 UFC valor este, 15 vezes maior do que os encontrados no filtro do ambiente A.

A contagem de UFC permaneceu abaixo de 13 UFC em quase todas as coletas. Apenas algumas coletas apresentaram valores elevados em relação aos demais, como na 1ª e 5ª coletas do filtro A, e na 11ª coleta do filtro B, não foi verificado isolamento de fungos na 14ª e 16ª coletas desse mesmo filtro.



**FIGURA 9** - Distribuição de UFC de fungos isolados dos filtros (A e B) dos condicionadores de ar dos dois ambientes da UTI neonatal do Hospital Universitário Prof. Dr. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, Maceió, AL durante as 20 coletas realizadas no período de Abril de 2007 a Março de 2008.

Na Figura 10, podemos observar as principais espécies encontradas nos filtros dos condicionadores de ar dos ambientes da UTI neonatal. Dos filtros dos condicionadores de ar foram isoladas 77 (37,7%) UFC *Cladosporium cladosporioides*, seguido 30 (14,7%) UFC *C. herbarum*, 18 (8,8%) UFC *C. sphaerospermum*, 17 (8,4%) UFC *Penicillium aurantiogriseum*, 14 (6,9%) UFC *P. expansum*, 14 (6,9%) UFC *Aspergillus oryzae*, 11 (5,4%) UFC *A. fumigatus*, 10 (4,9%) UFC *P. citrinum*, oito (3,9%) UFC *A. niger* e cinco (2,4%) UFC *P. purpurogenum*.



**FIGURA 10** - Frequência das principais espécies isolados dos filtros dos condicionadores de ar dos ambientes da UTI neonatal do Hospital Universitário Profº. Dr. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, Maceió, AL.

#### 5.4 - Isolamento de Leveduras nas Amostras Clínicas

Foram encaminhadas ao laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário Profº. Dr. Alberto Antune-HUPAA/UFAL, 73 amostras clínicas provenientes dos recém-nascidos internados na UTI neonatal, sendo a urina a mais frequente com 58 (79,5%) amostras, seguido LCR (Líquido Encéfalo Raquidiano) com nove (12,3%), pontas de cateteres com quatro (5,5%) e sangue com duas (2,7%) amostras (**Tabela 5**).

Das 58 (79,5%) amostras de urina obtidas 29 (39,8%) foram positivas em cultura, seguido por ponta de cateter que apresentou dois (2,7%) casos positivos para levedura, sendo observado o isolamento de 31 (42,5%) de leveduras nas amostras clínicas analisadas, como mostra a Tabela 5.

**TABELA 5** - Ocorrência de leveduras nas amostras clínicas de urina, LCR, ponta de cateter e sangue provenientes dos neonatos internados na UTI neonatal do Hospital Universitário Prof. Dr. Alberto Antunes-HUPAA/UFAL, Maceió, AL.

<b>AMOSTRAS CLÍNICAS</b>	<b>CASOS POSITIVOS (%)</b>	<b>CASOS NEGATIVOS (%)</b>	<b>TOTAL (%)</b>
URINA	29 (39,8%)	29 (39,7%)	58 (79,5%)
LCR	-	9 (12,3%)	9 (12,3%)
PONTA DE CATETER	2 (2,7 %)	2 (2,8%)	4 (5,5%)
SANGUE	-	2 (2,7%)	2 (2,7%)
<b>TOTAL</b>	<b>31 (42,5%)</b>	<b>42 (57,5%)</b>	<b>73 (100%)</b>

### 5.5 - Identificação de Espécies de Leveduras do Gênero *Candida* no Ambiente e nas Amostras Clínicas dos Recém-nascidos

Das 90 leveduras obtidas 59 (65,6%) foram isoladas das amostras do ar e 31 (34,4%) foram provenientes das amostras clínicas dos recém-nascidos. Destas 39 (43,3%) foram identificadas como *C. parapsilosis* sendo, 35 (38,9%) provenientes do ar do ambiente da UTI neonatal e quatro (4,4%) das amostras clínicas dos recém-nascidos.

Entre as 25 (27,8%) leveduras determinadas como *C. albicans*, sete (7,8%) foram isoladas do ambiente e 18 (20,0%) das amostras clínicas dos recém-nascidos. Onze (12,2%) isolados de *C. guilliermondii* foram obtidos apenas dos ambientes.

Das 10 (11,1%) identificadas como *C. tropicalis* sete (7,8%) foram procedentes dos recém-nascidos, três (3,3%) do ambiente. E dentre as cinco leveduras não identificadas duas (2,3%) foram procedentes dos recém-nascidos e três (3,3%) isoladas do ambiente (**Tabela 6**).

**TABELA 6** - Frequência das espécies de leveduras isoladas das amostras clínicas dos recém-nascidos e do ambiente da UTI neonatal do Hospital Universitário Prof<sup>o</sup>. Dr. Alberto Antunes HUPAA/UFAL, Maceió, AL.

<b>ESPÉCIES</b>	<b>RECÉM-NASCIDO (%)</b>	<b>AMBIENTE (%)</b>	<b>TOTAL</b>
<i>Candida parapsilosis</i>	4 (4,4%)	35 (38,9%)	39 (43,3%)
<i>C. albicans</i>	18 (20,0%)	7 (7,8%)	25 (27,8%)
<i>C. guilliermondii</i>	-	11 (12,2%)	11 (12,2%)
<i>C. tropicalis</i>	7 (7,8%)	3 (3,3%)	10 (11,1%)
Não Identificadas	2 (2,3%)	3 (3,3%)	5 (5,6%)
<b>TOTAL</b>	<b>31 (34,5%)</b>	<b>59 (65,5%)</b>	<b>90 (100%)</b>

Com relação às 59 leveduras isoladas do ar 34 (57,6%) foram obtidas antes e 25 (42,4%) após a limpeza do ambiente da UTI neonatal. Entre as 26 (44,1%) leveduras isoladas do ambiente A, 17 (28,8%) foram verificadas antes e 9 (15,3%) após a limpeza. E das 33 (55,9%) leveduras obtidas do ambiente B, 17 (28,8%) foram isoladas antes e 16 (27,1%) após a limpeza (Tabela 7).

**TABELA 7** - Frequência de leveduras isoladas antes e após a limpeza nos dois ambientes (A e B) da UTI neonatal do Hospital Universitário Prof<sup>o</sup>. Dr. Alberto Antunes HUPAA/UFAL de Maceió, AL.

<b>LEVEDURAS</b>	<b>AMBIENTE A (%)</b>	<b>AMBIENTE B (%)</b>	<b>TOTAL</b>
ANTES DA LIMPEZA	17 (28,8%)	17 (28,8%)	34 (57,6%)
APÓS A LIMPEZA	9 (15,3%)	16 (27,1%)	25 (42,4%)
<b>TOTAL</b>	<b>26 (44,1%)</b>	<b>33 (55,9%)</b>	<b>59 (100%)</b>

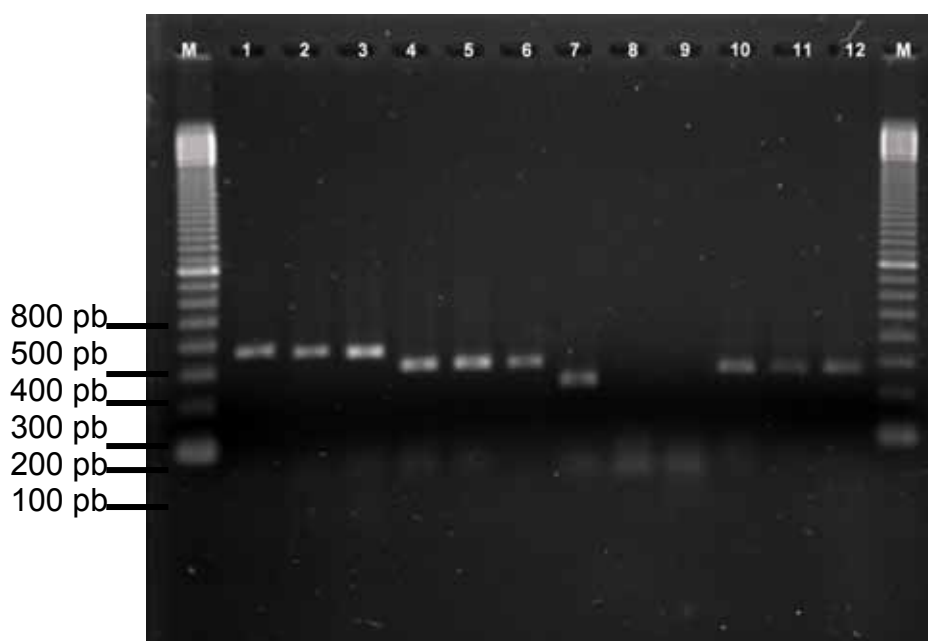
A Tabela 8 mostra as espécies de *Candida* isoladas das amostras clínicas dos recém-nascidos e do ambiente da UTI neonatal. Os isolados RN 8 e 12; AM 8 e 32, após a purificação revelaram a presença de duas colônias morfológicamente diferentes (subdivididas em A e B), mas a identificação molecular revelou estas como sendo da mesma espécie.

**TABELA 8** - Espécies de *Candida* isoladas das amostras clínicas dos recém nascidos (RN) e dos ambientes (AM) A e B da UTI neonatal do Hospital Universitário Prof. Dr. Alberto Antunes HUPAA/UFAL de Maceió, AL.

ISOLADO	PROCEDÊNCIA	ESPÉCIES	ISOLADO	PROCEDÊNCIA	ESPÉCIES
RN1	Urina	<i>C. tropicalis</i>	AM14	Ambiente A	<i>C.parapsilosis</i>
RN2	Urina	<i>C. albicans</i>	AM15	Ambiente A	<i>C.parapsilosis</i>
RN3	Urina	<i>C.parapsilosis</i>	AM16	Ambiente B	<i>C.parapsilosis</i>
RN4	Urina	<i>C.parapsilosis</i>	AM17	Ambiente A	<i>C.parapsilosis</i>
RN5	Urina	<i>C. albicans</i>	AM18	Ambiente B	<i>C.parapsilosis</i>
RN6	Urina	<i>C. albicans</i>	AM19	Ambiente B	<i>C.parapsilosis</i>
RN7	Urina	<i>C. tropicalis</i>	AM20	Ambiente A	<i>C. albicans</i>
RN8 A	Urina	<i>C. albicans</i>	AM21	Ambiente A	<i>C.parapsilosis</i>
RN8 B	Urina	<i>C. albicans</i>	AM22	Ambiente A	<i>C.parapsilosis</i>
RN9	Urina	<i>C. albicans</i>	AM23	Ambiente B	Não identificada
RN10	Urina	<i>C. tropicalis</i>	AM24	Ambiente A	<i>C.parapsilosis</i>
RN11	Urina	<i>C. albicans</i>	AM25	Ambiente A	<i>C.parapsilosis</i>
RN12 A	Urina	<i>C. tropicalis</i>	AM26	Ambiente A	<i>C. guilliermondii</i>
RN12 B	Urina	<i>C. tropicalis</i>	AM27	Ambiente A	<i>C.parapsilosis</i>
RN13	Urina	<i>C. tropicalis</i>	AM28	Ambiente B	<i>C. guilliermondii</i>
RN14	Urina	<i>C. albicans</i>	AM29	Ambiente A	<i>C.parapsilosis</i>
RN15	Urina	Não identificada	AM30	Ambiente A	<i>C. albicans</i>
RN16	Urina	<i>C. tropicalis</i>	AM31	Ambiente B	<i>C.parapsilosis</i>
RN17	Urina	<i>C.parapsilosis</i>	AM32 A	Ambiente A	<i>C.parapsilosis</i>
RN18	Urina	<i>C.parapsilosis</i>	AM32 B	Ambiente A	<i>C.parapsilosis</i>
RN19	Urina	<i>C. albicans</i>	AM33	Ambiente B	<i>C.parapsilosis</i>
RN20	Urina	<i>C. albicans</i>	AM34	Ambiente B	<i>C.parapsilosis</i>
RN21	Cateter	<i>C. albicans</i>	AM35	Ambiente A	<i>C.parapsilosis</i>
RN22	Urina	<i>C. albicans</i>	AM36	Ambiente A	<i>C.parapsilosis</i>
RN23	Urina	<i>C. albicans</i>	AM37	Ambiente B	<i>C. albicans</i>
RN24	Urina	<i>C. albicans</i>	AM38	Ambiente A	<i>C.parapsilosis</i>
RN25	Urina	<i>C. albicans</i>	AM39	Ambiente B	<i>C. tropicalis</i>
RN26	Urina	Não identificada	AM40	Ambiente B	Não identificada
RN27	Urina	<i>C. albicans</i>	AM41	Ambiente A	<i>C. guilliermondii</i>
RN28	Urina	<i>C. albicans</i>	AM42	Ambiente B	<i>C. guilliermondii</i>
RN29	Cateter	<i>C. albicans</i>	AM43	Ambiente B	<i>C. guilliermondii</i>
AM1	Ambiente B	<i>C. tropicalis</i>	AM44	Ambiente B	<i>C.parapsilosis</i>
AM2	Ambiente A	<i>C.parapsilosis</i>	AM45	Ambiente A	<i>C.parapsilosis</i>
AM3	Ambiente A	<i>C.parapsilosis</i>	AM46	Ambiente A	<i>C.parapsilosis</i>
AM4	Ambiente B	<i>C. albicans</i>	AM47	Ambiente B	<i>C.parapsilosis</i>
AM5	Ambiente B	<i>C.parapsilosis</i>	AM48	Ambiente A	<i>C.parapsilosis</i>
AM6	Ambiente B	<i>C. albicans</i>	AM49	Ambiente B	<i>C. guilliermondii</i>
AM7	Ambiente B	<i>C. tropicalis</i>	AM50	Ambiente B	<i>C.parapsilosis</i>
AM8 A	Ambiente B	<i>C.parapsilosis</i>	AM51	Ambiente A	<i>C.guilhermondii</i>
AM8 B	Ambiente B	<i>C.parapsilosis</i>	AM52	Ambiente A	<i>C.parapsilosis</i>
AM9	Ambiente B	<i>C. albicans</i>	AM53	Ambiente B	<i>C. guilliermondii</i>
AM10	Ambiente B	<i>C.guilhermondii</i>	AM54	Ambiente B	<i>C. guilliermondii</i>
AM11	Ambiente B	<i>C.parapsilosis</i>	AM55	Ambiente B	<i>C. guilliermondii</i>
AM12	Ambiente A	<i>C. albicans</i>	AM56	Ambiente B	<i>C.parapsilosis</i>
AM13	Ambiente A	Não identificada	AM 57	Ambiente B	<i>C.parapsilosis</i>

## 5.6 - Amplificação com os iniciadores espécie-específicos utilizados na identificação de leveduras do gênero *Candida*

A amplificação com os iniciadores espécie-específicos para *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. kruzei* e *C. parapsilosis* estão ilustrados na Figura 11. Pode-se verificar que houve amplificação de todas as espécies de *Candida* utilizadas como controles positivos provenientes da Coleção de Culturas da Micoteca URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, e das amostras coletadas do ambiente e dos recém-nascidos com os iniciadores espécie-específicos, exceto com relação à espécie *C. kruzei* que amplificou apenas a amostra controle (*C. kruzei* URM1059), não sendo verificada amplificação tanto as amostras do ambiente quanto nas dos recém-nascidos para esta espécie.



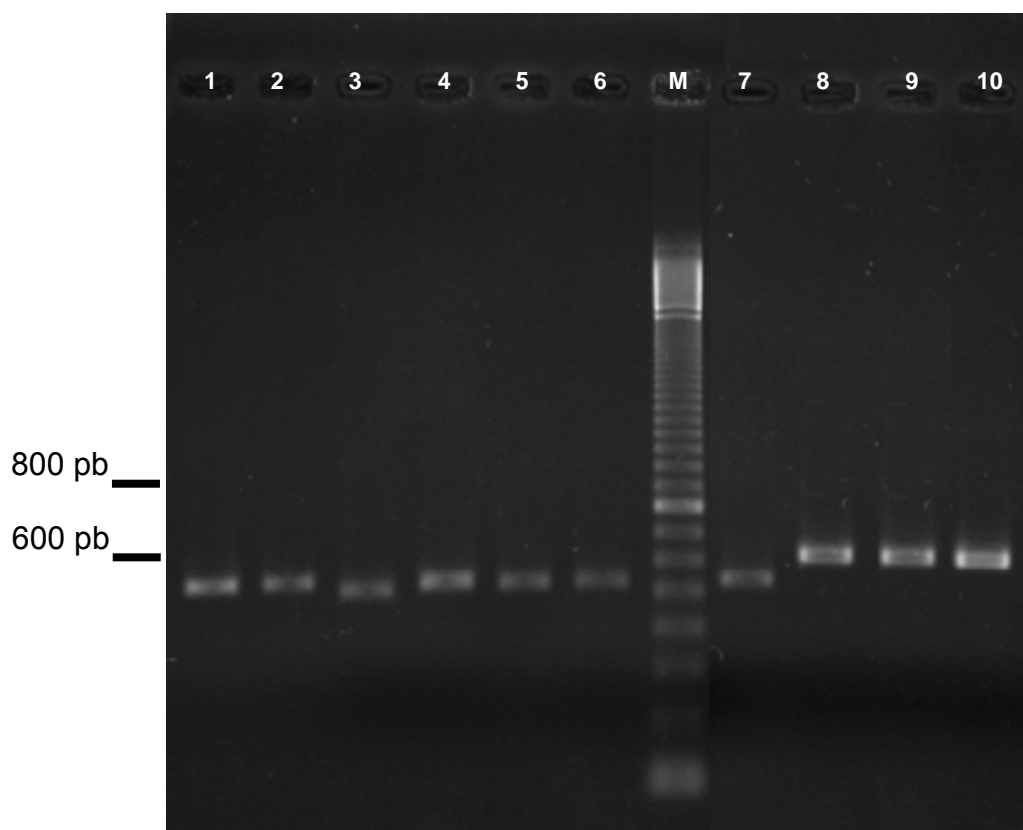
**FIGURA 11** - Eletroforese em gel de agarose após PCR com os iniciadores espécie-específicos ilustrando os produtos da amplificação. Linhas de 1 a 12; M - Marcador de 100 pares de base (pb); Linha 1- *C. tropicalis* URM5694 (357 pb); 2 - AM1; 3 - RN 1; 4 - *C. parapsilosis* URM5583 (300 pb); 5 - AM 48; 6 - RN 3; 7 - *C. kruzei* URM1059 (258 pb); 8 - AM 15; 9 - RN 1; 10 - *C. albicans* URM5984 (273 pb); 11 - AM 9; 12 - RN 20.

É importante salientar que os iniciadores utilizados para identificar as espécies *C. glabrata* e *C. guilliermondii* não amplificaram as amostras controle *C. glabrata* URM5594 e *C. guilliermondii* URM5563 por isso, não foram utilizados para identificação das leveduras isoladas neste trabalho. Outro impasse ocorrido foi que, o iniciador espécie - específico para *C. albicans* amplificava também *C. glabrata* e o iniciador utilizado para identificar *C. parapsilosis* igualmente amplificava *C. guilliermondii*.

Para diferenciar essas duas espécies foi realizada a amplificação da região ITS 1 e ITS 4 do DNA ribossomal de todas as culturas de *C. glabrata* e *C. parapsilosis* inicialmente identificadas pelos iniciadores espécie - específicos. Na figura 12 observa-se os resultados das amplificações das leveduras provenientes da Micoteca URM de Recife e do ambiente da UTI neonatal. As leveduras que amplificavam um fragmento de 800 pb foram identificadas como *C. glabrata* e aquelas que amplificaram um fragmento com 600 pb como *C. guilliermondii*.

Ainda na **Figura 12**, pode ser verificado antes do marcador de peso molecular, que todas as amostras controle proveniente da Micoteca URM de Recife geraram fragmentos entre 500 e 550 pb. Assim, não foi possível utilizar as amostras de *C. glabrata* e *C. guilliermondii* da micoteca como referência para amplificação dos iniciadores ITS1 e ITS4.





**FIGURA 12** - Eletroforese em gel de agarose após PCR com os iniciadores ITS 1 e ITS 4 das amostras controles da micoteca URM e das amostras isoladas do ambiente da UTI neonatal. Linhas de 1 a 10; 1- *C. albicans* URM5984 (550 pb); 2 - *C. glabrata* URM5594 (550 pb); 3 - *C. kruzei* URM1059 (500 pb); 4 - *C. tropicalis* URM5694 (550 pb); 5 e 7 - *C. guilliermondii* URM5563 (550 pb); 6 - *C. parapsilosis* URM5583 (550 pb); M - Marcador de 100 pb; 8 - AM 26 (600 pb); 9 - AM 51(600 pb); 10 - AM 53 (600 pb).

## 6.0 DISCUSSÃO

### 6.1 - Quantificação das UFC do Ar

A partir das 400 exposições de placas realizadas foi observado o crescimento de colônias fúngicas tanto antes quanto após a limpeza dos dois ambientes da UTI neonatal, como ilustra a Figura 5. Carmo et al. (2007), em seus estudos sobre a microbiota fúngica presente em setores de um hospital público em Campina Grande na Paraíba, ao expor 30 placas detectaram 218 colônias de fungos anemófilos.

Menezes et al. (2005) avaliaram a sala de periódicos da biblioteca de ciências da saúde da Universidade Federal do Ceará e isolaram 220 colônias em 50 exposições. Aydogdu et al. (2004) ao realizar 90 exposições de placas em escolas primárias da cidade de Edirne na Turquia, obtiveram 941 colônias fúngicas. Segundo Mc Donald et al. (1998), as placas contendo meio de cultura destinadas ao crescimento microbiano e colocadas em ambientes, servem apenas como alerta microbiológica.

Entretanto, a utilização de equipamentos como os impactadores de ar com aceleração linear como é preconizado pela Agencia Nacional de Vigilância Sanitária para pesquisa de fungos e bactérias viáveis no ar de ambientes climatizados, geram resultados quantitativos fieis a realidade do ambiente diretamente pela contagem de UFC resultantes correlacionadas com a quantidade do volume de ar insuflado pelo equipamento.

O ambiente A foi o mais representativo com relação ao número de UFC isoladas. Não foi verificada uma redução significativa de UFC no ambiente A após a realização da limpeza. Entretanto, no ambiente B houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), sendo assim, pode-se afirmar que ocorreu a diminuição da contagem de fungos anemófilos após a realização da limpeza (**Figura 6**), o desejável para uma limpeza eficaz, seria que não houvesse crescimento fúngico ou apresentasse crescimento mínimo dentro dos padrões adotados atualmente pela vigilância sanitária.

Um dos fatores que podem estar relacionados com a não diminuição de UFC no ambiente A, foi a limpeza ocorrer primeiro no ambiente B permitindo a passagem dos esporos fúngicos através da reutilização dos panos e do uso

de soluções pouco concentradas que não permitiram a eliminação dos microrganismos. Dessa forma, seria necessário o monitoramento constante para avaliar a resistência dos fungos a algumas soluções e adequar à concentração inibitória mínima frente aos desinfetantes mais utilizados na rotina.

Estudos realizados por Andrade et al. (2000), sugerem que a limpeza de forma inadequada desloca a carga microbiana para outros pontos ao invés de diminuí-la, assim ocorre a manutenção da quantidade de microrganismos, na qual já era encontrado antes mesmo da limpeza. Fato este confirmado neste estudo, pois a limpeza não reduziu a contagem de UFC no ambiente A.

Segundo a Comissão de Controle de Infecções (CCI) de Ribeirão Preto (2006) todos os utensílios (panos de mobília e pisos, escovas e baldes) utilizados em áreas crítica como UTIs devem ser lavados ou trocados depois de serem utilizados no ambiente.

Estudos realizados com a finalidade de avaliar a efetividade da limpeza em geral evidenciaram que a higienização mecânica proporciona diminuição de 80% na quantidade de microrganismos e com a utilização de desinfetante houve a eliminação de 90% a 95% (ZANCONATO et al., 2007).

No processo de limpeza de unidades de terapia intensiva é recomendado à utilização de produtos químicos com ação antimicrobiana, eficaz para eliminação de microrganismos existentes em superfícies (PANNUTI, 1997; BRASIL, 1998).

## **6.2 - Microbiota Fúngica do Ar**

No presente estudo foram descritos 23 gêneros e 41 espécies de fungos, como pode ser observado na Tabela 4. Estudos semelhantes a este foram realizados por Lugauskas e Krikstaponis (2004) que ao avaliar fungos do ar em alguns hospitais e instituições médicas da Lituânia identificaram 20 espécies atribuídas a oito gêneros. Martins-Diniz et al. (2005), ao monitorar fungos em uma unidade hospitalar do Estado de São Paulo, Brasil, isolaram 30 diferentes gêneros não identificando em nível de espécie. Na literatura brasileira pesquisada os estudos sobre microbiota fúngica do ar não identificam

em nível de espécie os fungos filamentosos devido às dificuldades como tempo de crescimento, ausência de estruturas reprodutivas e ornamentações fúngicas, carência de literatura especializada, sobretudo na área de taxonomia.

Estudos aerobiológicos realizados em países temperados apontam os fungos demáceos, em especial o gênero *Cladosporium*, como predominantes no ar e na poeira dos ambientes (SALOMON et al., 2006). A principal espécie que causa doença em humanos deste gênero é representada pela espécie *Cladosporium bantianum*, não isolada neste estudo, que em casos raros podem causar abscessos cerebrais (DEB et al., 2005).

Entretanto a espécie *C. herbarum* isolada no ar da UTI neonatal é relatada por causar cromomicose e as outras espécies deste gênero têm a capacidade de desencadear reações alérgicas em pessoas sensíveis (PETERNEL et al., 2004).

Estudos realizados por Beaumont et al. (1985) no Nordeste da Holanda, Halwagy (1989) em três cidades do Kuwait, Savino e Caretta (1992) em Yokohama no Japão, Dixit et al. (2000) em estudos no Texas, demonstraram que espécies de *Cladosporium* estão entre as de maior ocorrência em pesquisas de monitoramento de fungos no ar de interiores.

As espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* são importantes por causarem infecções em seres humanos como peniciliose e aspergilose, por produzirem micotoxinas, metabólicos secundários que podem lesionar o organismo e causar efeitos adversos à saúde (JARVIS e MILLER, 2005; MURTONIEMI et al., 2005; BUSH et al., 2006; JOHANNESSEN et al., 2007). Segundo a resolução nº 9, de 16 de janeiro de 2003 (**Anexo 2**) “é inaceitável a presença de fungos patogênicos e toxicogênicos em ambientes climatizados de uso público e coletivo” (BRASIL, 2003c).

*Aspergillus fumigatus* é apontado como o principal patógeno causador de aspergilose pulmonar invasiva em imunocomprometidos (HOFFMAN et al., 1999; PERFECT et al., 2001). Estes autores mencionam que o diagnóstico insatisfatório e o tratamento tardio, são fatores agravantes desta circunstância, resultando em 50% de mortalidade. Entretanto, Oren et al. (2001) relataram uma taxa de 95% de mortalidade em pacientes submetidos a transplante de medula óssea.

Outro fungo que merece destaque no presente estudo é o *Stachybotrys chartarum* que foi relatada em alguns estudos como causando hemossiderose pulmonar em crianças ocorrendo através da inalação dos esporos desse fungo (DEARBORN et al., 1999; ELIDEMIR et al., 1999; FLAPPAN et al., 1999). A Hemossiderose pulmonar é caracterizada por uma hemorragia crônica que leva à observação de macrófagos carregados de uma enzima (hemossiderina) nos pulmões de lactentes e pode ser fatal (DEARBORN et al., 1999).

Alguns autores como Humphreys (1998) e Eickhoff (1994) questionam a dificuldade de quantificar o risco de infecção hospitalar causada por patógenos suspensos no ar que são inalados pelo paciente. Entretanto, Gambele et al. (1993) e Mezzari et al. (2002) relataram que a exposição aos propágulos fúngicos oportunistas podem desencadear manifestações como rinite alérgica, conjuntivite ou ataques de asma brônquica em indivíduos suscetíveis a fungos alérgenos.

A avaliação de fungos anemófilos antes e após a limpeza dos ambientes A e B evidenciou a redução do número de UFC de *Cladosporium* spp.. Entretanto, houve o aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da contagem de UFC de *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. obtidas após a limpeza (**Figura 7**). Este dado pode está relacionado a alta disseminação e esporulação produzida por esses fungos bem como aos procedimento inadequado de higienização de resuspender os esporos no ambiente.

Segundo Leenders et al. (1999) algumas precauções como a utilização de sistemas eficientes no suprimento de ar, com uma quantidade mínima de bioaerossóis, além do isolamento do ambiente interno em relação ao meio exterior do prédio são sugeridas para limitar a exposição a fungos anemófilos patogênicos contribuindo para redução de infecções fúngicas nos ambientes hospitalares.

No que se refere à sazonalidade dos fungos durante o período de Abril de 2007 a Março de 2008 ilustrada na Figura 8, *Cladosporium* spp. apresentaram maior frequência nos meses de outono e inverno, *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. nos meses da primavera. Para Medrela-kuder (2003), o número máximo de propágulos destes fungos ocorreram nos meses do verão, comprovando desta maneira a influência de fatores abióticos como temperatura

e umidade na distribuição dos fungos anemófilos, bem como da localização geográfica.

Segundo Gambale et al., (1993), Lacaz et al. (2002) e Mezzari et al. (2002), os fungos apresentam variações muito amplas em sua incidência, de acordo com a estação do ano, temperatura, umidade relativa do ar, hora do dia, velocidade e direção do vento, presença de atividade humana e tipo de climatização do ambiente.

De maneira geral, os resultados da análise qualitativa dos fungos do ar da UTI-neonatal foram bastante expressivos e inquietantes. A detecção de diferentes espécies de fungos sabidamente patogênicos, toxicogênicos ou alergizantes nos ambientes estudados reflete a situação que, provavelmente, pode estar ocorrendo em outros setores do Hospital Universitário Prof.º Dr. Alberto Antunes-HUPAA, mas sobre as quais não temos informações consistentes por não existirem procedimentos rotina para avaliar as condições do ambiente.

### **6.3 - Microbiota Fúngica dos filtros dos condicionadores de ar**

A análise quantitativa das UFC dos dois filtros dos condicionadores de ar dos ambientes A e B da UTI neonatal, ilustrada na **Figura 9**, evidenciaram a frequência de UFC significativamente maior ( $p < 0,05$ ) no filtro do condicionador de ar do ambiente A, devido à manutenção inadequada nos neste filtro. Vele salientar que até a quinta coleta o aparelho de condicionador de ar apresentava condições inadequadas para uso sendo posteriormente trocado.

Com relação aos resultados das análises qualitativas dos fungos dos filtros dos condicionadores de ar, foram observadas a presença das mesmas espécies isoladas nos ambientes da UTI neonatal (**Figura 10**), comprovando a eficácia dos sistemas de climatização no que referente à capacidade de filtrar partículas.

Espécies de *Cladosporium* foram também encontrados com maior frequência nos filtros dos condicionadores de ar. Morbim e Salmito (2006), ao avaliar microbiota fúngica dos condicionadores de ar em UTI de Teresina-PI, observaram que o *Aspergillus niger*, foi à espécie mais encontrada, presente

em 60% dos condicionadores de ar das UTIs, seguida por *Aspergillus fumigatus* e *Trichoderma koningii* 50%. Espécies estas, encontradas neste estudo em menor frequência, com exceção de *Trichoderma koningii*.

Segundo a portaria nº 3523 do ANVISA (BRASIL, 2003) é recomendado a higienização mensal dos componentes do sistema de climatização, porém no componente usados para umedecer o ar, recomenda-se limpeza quinzenal o que geralmente não era realizada nos dois ambientes da UTI neonatal estudada, proporcionando o crescimento de microrganismos e inalação de partículas dos mesmos.

Afonso et al. (2008), participaram de uma investigação epidemiológica de surtos de infecção hospitalar em áreas críticas, onde os sistemas de ar condicionado foram indicados como fonte de microrganismos causadores de infecção. Segundo Moscato (2000), as infecções exógenas oriundas do ambiente hospitalar são as que merecem maior atenção dos sanitaristas, pois são provocadas por agentes cuja fonte é o ser humano, funcionários, pacientes e visitantes, e também por equipamentos e instrumentos.

Neste sentido, foram verificadas algumas falhas que poderiam contribuir para o aumento da microbiota fúngica no ambiente estudado como a utilização de proteção individual por apenas algumas pessoas, as mães dos neonatos reutilizarem as mesmas batas, a limpeza dos filtros dos condicionadores não serem constantes e a principal e mais agravante é o método de lavagem das mãos, ser realizado de maneira inadequada pelas pessoas que manuseiam os recém-nascidos.

Para a prevenção e controle da microbiota fúngica presente tanto no ambiente como nos condicionadores de ar são sugeridas as medidas: os profissionais devem estar munidos de Equipamento de Proteção Individual (EPIs), ao adentrar nas UTIs dos hospitais; reforçar as medidas de controle de infecção hospitalar nas UTIs; sensibilizar os profissionais de UTIs para a existência de infecções fúngicas; estudar formas de maior ventilação de ar que possibilitem o arejamento do ambiente para evitar o acúmulo dos esporos fúngicos nestes ambientes; efetuar a limpeza dos condicionadores de ar quinzenalmente e comunicar e alertar as autoridades de saúde que os fungos

são os principais contaminantes do meio ambiente (MORBIM e SALMITI, 2006).

#### 6.4 - Isolamento de Leveduras nas Amostras Clínicas

A amostra clínica urina foi a mais representativa com 58 (79,5%) amostras, destas 29 (39,8%) foram casos positivas para leveduras, como pode-se verificar na Tabela 5. Em nenhuma outra amostra clínica foram observadas estruturas de leveduras ao microscópio ou obteve-se o isolamento em cultura, exceto ponta de cateter, que foi verificado duas (2,7%) amostras positivas.

Apesar da candidúria, definida como a presença de levedura na urina, ser na maioria dos casos assintomática resultante da colonização do trato urinário, pode-se sugerir um indício de processos infecciosos mais graves nos rins, que quando decorrente de disseminação hematogênica das leveduras para esse órgão, podem causar lesões graves com alta mortalidade e morbidade (KAUFFAMAN et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001; ZAOUTIS et al., 2005).

A infecção do trato urinário é a infecção hospitalar mais comum nos EUA, representando de 30 a 40% de todas as infecções adquiridas em hospitais (FOXMAN, 2002). Na Europa, *Candida* spp. está entre os três microrganismos mais encontrados em pacientes internados com infecção urinária (BOUZA et al., 2001).

Um estudo realizado por Oliveira et al. (2007) demonstraram que entre os fatores predisponentes associados à candidúria, o uso prévio de cateter urinário foi responsável por 83% dos casos, superado apenas pela terapia antibiótica (93%). Lucchetti et al. (2005) identificaram *Candida* sp. como o terceiro agente causador de infecção urinária em pacientes com cateterização vesical crônica .

Em nosso estudo não foi observada a presença de fungos filamentosos em nenhuma das amostras clínicas analisadas. Entretanto, Rodrigues et al. (2007) relatam infecções hospitalares fatais causadas por fungos filamentosos, especialmente aqueles pertencentes as espécies *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium solani*. Sendo as leveduras responsáveis por 90% das infecções fúngicas (PFALLER, DIEKERNA, 2007).



A relação entre os óbitos dos recém-nascidos por infecção fúngica não foi mencionada devido à falta de dados nos atestados médico das declarações de óbitos que não relatava que tipo de infecção (fúngica e/ou bacteriana) teria levado ao óbito. E esta limitação dificultou a compreensão sobre os dados com relação à mortalidade por possíveis infecções fúngicas.

### **6.5 - Espécies de Leveduras do Gênero *Candida* no Ambiente e nas Amostras Clínicas dos Recém-nascidos**

Na Tabela 6, pode-se verificar que das 90 leveduras identificadas, 59 (65,6%) foram obtidas dos ambientes estudados e 31 (34,4%) foram isoladas das amostras clínicas provenientes dos recém-nascidos. O fato das espécies *C. parapsilosis*, *C. albicans* e *C. tropicalis* serem isoladas tanto no ambiente como nas amostras clínicas dos recém-nascidos sugere que estas leveduras foram carregadas do ambiente para os neonatos. E o fato ser encontrado *C. albicans* no local estudado define como um ambiente contaminado. Alguns autores relatam que as espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* juntas são responsáveis por infecções neonatais superior a 90% (WENZEL, 1995; LIZIOLI et al., 2003; PASSOS et al., 2005).

De maneira geral, as leveduras do ar dos ambientes da UTI neonatal foram isoladas na mesma proporção antes e após a limpeza (**Tabela 7**). O ambiente A apresentou o maior número de isolados de leveduras, sendo *C. parapsilosis* a mais freqüente, essa espécie é considerado um agente de infecções exógenas por colonizar a pele, principalmente as mãos de profissionais da saúde, assim como soluções glicosadas de uso hospitalar e cateter venoso central (FRANÇA et al., 2008). E sua ocorrência é alta em crianças e recém-nascidos prematuros internados em unidades de terapia intensiva (MATSUMOTO et al., 2002; CANO et al., 2005).

Segundo Cartón et al. (2001), Cardens et al. (2004) e Sam Miguel et al. (2005) os fatores de risco associados à transmissão de *C. parapsilosis* são as mãos colonizadas dos profissionais que prestam atendimento ao paciente, nutrição parenteral, e o uso prolongado de cateteres.

Com relação às infecções causada por cateter Marconi et al. (2009) ao avaliarem culturas de ponta de cateteres no diagnostico de infecção

neonatal, encontraram *C. parapsilosis* entre os microrganismos envolvidos nesse tipo de infecção. Entretanto no presente estudo as duas culturas positivas obtidas de ponta de cateteres foram identificadas como *C. albicans*.

Nossos achados quanto às espécies de leveduras são compatíveis com a literatura que aponta *C. albicans* como a levedura mais comumente isolada em infecções urinárias. Entretanto, estudo realizado por Oliveira et al. (2001) sobre infecção urinária por leveduras encontraram frequência de *C. tropicalis* superior (53%), à de *C. albicans* (36%).

Indivíduos normais raramente apresentam candidúria, no entanto, entre os pacientes hospitalizados vários fatores têm sido relacionados a um maior risco para o desenvolvimento de candidúria como a idade avançada, sexo feminino, antibioticoterapia de amplo espectro, o uso de corticosteróides e imunossupressores, presença de anormalidades do trato urinário, diabetes, sondagem vesical de demora, pós-operatório de cirurgias de grande porte e doenças malignas (FANELLO et al., 2001; LUDSTROM, SOBEL, 2001; WEINBERGGER et al., 2003; KAUFFMAN, 2005).

As leveduras do gênero *Candida* constituem o principal fungo envolvido no acometimento de infecções hospitalares (COLOMBO et al, 2006). *C. albicans* é a principal espécie do gênero associada às infecções urinárias, mas outras também são relatadas, como: *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefir* e *C. guilliermondii* (MARTINEZ et al., 2001).

As casuísticas do Brasil confirmam que as três espécies mais prevalentes isoladas de urina em pacientes hospitalizados são: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Estes estudos demonstram prevalências de 35,5 a 70% para *C. albicans*; 4,6 a 52,5% para *C. tropicalis* e 7 a 8,8% para *C. glabrata* (OLIVEIRA et al., 2001; KOBAYASHI et al., 2004; PASSOS et al., 2005; BENELLI et al., 2006).

Em pacientes expostos a fatores de risco para infecção urinária por *Candida*, o achado de candidúria pode significar colonização ou infecção. Nestes pacientes, a contagem de colônias é muito variável e diretamente dependente da metodologia utilizada para a coleta de material. Sendo assim, o isolamento de *Candida* na urina pode ocorrer mesmo na ausência de doença, sendo que existe grande controvérsia sobre a valorização da contagem de colônias obtida em cultura, procedimento este com baixa especificidade e

sensibilidade na diferenciação entre pacientes colonizados e infectados por este agente (NAVARRO et al., 1997; SOBEL, 2002).

Alguns autores sugerem que exista maior relação entre candidúria e infecção urinária quando a contagem de colônias na cultura de urina atinge valores da ordem de 1.000 a 10.000UFC/mL. Entretanto, contagens inferiores podem ser encontradas em pacientes com infecção do trato urinário (ITU) por *Candida*, particularmente nos casos de pielonefrite adquirida por via hematogênica decorrente de candidíase sistêmica, onde os rins funcionam como filtro e podem refletir contagens baixas na urina. Neste sentido, não há consenso entre os autores sobre o valor de corte específico para interpretação de culturas quantitativas de urina, no sentido de reconhecimento de pacientes com infecção urinária alta ou baixa (ANG et al., 1993; GUBBINS et al., 1993; FISHER, 2000; NCCLS, 2002; ALVAREZ-LERME et al., 2003).

No entanto, não se pode afirmar que as leveduras isoladas tanto da urina como dos cateteres estavam causando infecções nos recém-nascidos, pois, o isolamento em cultura realizado pelo hospital não utilizava métodos quantitativos para pesquisa de leveduras na urina. Entretanto, levando-se em consideração que o cateter urinário é um fator de risco para infecção e em duas amostras de urina com os respectivos cateteres foram isolados a mesma espécie, *C. albicans*, nesses dois recém-nascidos sugeriu-se que a levedura estaria causando infecção.

## **6.6 - Amplificação com os iniciadores espécie-específicos utilizados na identificação de leveduras do gênero *Candida***

Através dos iniciadores espécie-específicos foi possível identificar as espécies de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. kruzei* (**Figura 11**). Os iniciadores CALB1 e CALB2 (*C. albicans*); CPA1 e CPA2 (*C. parapsilosis*) foram considerados sensíveis, mas não específicos, pois o iniciador utilizado para *C. albicans* também amplificava *C. glabrata* (CGL1 e CGL2). Assim como o iniciador para *C. parapsilosis* amplificava *C. guilliermondii* (CGU1 e CGU2). Os iniciadores CGL1 e CGL2; CGU1 e CGU2 por não terem amplificado as amostras controles da Micoteca URM não foram utilizados neste trabalho. Sendo os iniciadores CTR1 e CTR2 (*C. tropicalis*); CKRU1 e CKRU2 (*C.*

*kruzei*), os únicos considerados sensíveis e específicos para as amostras de leveduras isoladas neste estudo.

Entretanto, quando os seis iniciadores utilizados neste estudo foram alinhados no programa Blast com as sequencias da base de dados, todas os iniciadores foram espécie-específicos com exceção do iniciador CGU 1 e CGU 2 que não foi verificada a similaridade com as sequencias de *C. guilliermondii* do banco de dados do Blast.

Hsu et al. (2003) identificaram fungos de interesse médico através de iniciadores para seqüências específicas de *C. albicans* (CALB1 e CALB2), *C. glabrata* (CGL1 e CGL2), *C. guilliermondii* (CGU1 e CGU2), *C. parapsilosis* (CPA1 e CPA2), *C. tropicalis* (CTR 1 e CTR2) *C. kruzei* (CKRU1 e CKRU2) e *Cryptococcus neoformans* (CN5 e CN 4), obtiveram apenas produtos de PCR amplificados de suas respectivas espécies.

Nesta pesquisa, utilizando os mesmos iniciadores para as espécies de *Candida* utilizados por Hsu et al. (2003), não foi possível identificar algumas espécies. Luo e Mitchell (2002) e Nazzal et al. (2005) utilizaram iniciadores específicos para identificação de diferentes espécies de *Candida* e obtiveram produtos de PCR para as respectivas espécies.

A Figura 12 ilustra a amplificação do locus ITS1 e ITS4 do DNA ribossomal de todas as amostras controle provenientes da Micoteca URM de Recife e das amostras AM 26, AM 51 e AM 53 isoladas do ambiente da UTI neonatal. Para as leveduras identificadas pelo iniciador espécie-específico como *C. glabrata*, foram obtidos produtos de PCR do DNA ribossomal para todas as amostras isoladas incluindo a amostra controle positiva URM5594 de *C. glabrata* um fragmento de 550pb.

Sendo o tamanho do fragmento encontrado neste estudo diferente dos observados por Cirak et al. (2003), ao identificar *Candida glabrata* por métodos moleculares encontraram um fragmento de 800pb. Portanto, não foi possível diferenciar através da região ITS do rDNA as leveduras *C. glabrata* de *C. albicans* pois as duas espécies apresentaram um fragmento de 550pb. Sendo consideradas, neste estudo, todas como *C. albicans*.

De todas as amostras que amplificaram com o iniciador espécie-específico CPA1 e CPA2 para *C. parapsilosis* ao ser realizado o ITS rDNA, 11 isolados de leveduras do ambiente amplificaram um fragmento de 600pb sendo

identificada como *C. guilliermondii*. Estudos realizados por Williams et al. (1995) encontraram um fragmento de 600 pb ao identificar *C. guilliermondii* através da amplificação da região ITS do DNA ribossomal.

As amostra de referência provenientes da Micoteca de URM amplificaram fragmentos entre 500 e 550 pb. A amostra URM5563 de *C. guilliermondii* gerou um fragmento de aproximadamente 550pb, não sendo considerada como essa espécie.

Outros resultados semelhantes a estes foram os obtidos por Guillamón et al. (1998) e Chen et al. (2001) que ao identificar leveduras de interesse médico baseada na região ITS do DNA ribossomal amplificaram um fragmento de aproximadamente 550 pb para as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* e um fragmento de 600 pb para *C. guilliermondii*.

## 7.0 CONCLUSÕES

**Os resultados obtidos neste estudo permitiram concluir que:**

- ✓ O ambiente A apresentou maior contaminação fúngica tanto antes quanto após a limpeza da UTI neonatal e no ambiente B a contaminação fúngica foi reduzida após a limpeza;
- ✓ O filtro do condicionador de ar do ambiente A apresentou contaminação fúngica maior que nos observados no filtro do condicionador de ar do ambiente B;
- ✓ Espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* foram isoladas com maior frequência após a realização da limpeza, sendo evidenciada a redução da contaminação fúngica com relação às espécies de *Cladosporium*;
- ✓ Espécies de *Cladosporium*, *Penicillium* e *Aspergillus* são consideradas pela literatura especializada como patogênicas, toxicogênicas ou alergizantes ao homem;
- ✓ O estudo temporal permitiu verificar que as espécies de *Cladosporium* ocorreram com maior frequência nos meses de outono e inverno e as espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* nos meses da primavera;
- ✓ As leveduras foram isoladas tanto antes quanto após a realização da limpeza nos dois ambientes avaliados, sendo as espécies *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* encontradas nas amostras do ar e nas dos recém-nascido;
- ✓ A espécie *C. kruzei* não esteve presente em nenhuma amostra do ar do ambiente ou do recém-nascido e a espécie *C. guilliermondii* esteve presente apenas nas amostras de leveduras provenientes do ambiente.

## 8.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização deste trabalho permitiu conhecer a microbiota existente na UTI neonatal do Hospital Universitário Prof<sup>o</sup>. Dr. Alberto Antunes/HUPAA, trabalho este, ainda pioneiro em áreas críticas de ambientes hospitalares no Estado de Alagoas. Sendo indispensável dar continuidade a este tipo de pesquisa em outras áreas hospitalares não apenas com o objetivo de identificar fungos como também bactérias causadoras infecções hospitalares.

Além da necessidade de se avaliar outros parâmetros como temperatura, CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) e umidade, assim como, a implantação das metodologias preconizadas pela ANVISA referentes à qualidade do ar de interiores em ambientes climatizados.

A presença de fungos considerados como patogênicos em paciente imunocomprometidos e as mesmas espécies de *Candida* serem encontradas no ambiente da UTI neonatal e nas amostras clínicas dos recém-nascidos confirmam a necessidade da padronização de normas técnicas para orientar os auxiliares de serviço referentes á limpeza do ambiente e de superfícies visando reduzir ou eliminar esses microrganismos.

Assim como o uso de proteção individual por parte de toda equipe da UTI neonatal que matem contato direto com os recém-nascidos, além da necessidade de lavar as mãos tanto antes quanto após os procedimentos realizados nos neonatos e o controle da circulação de pessoas são procedimentos capazes de evitar o acúmulo de esporos fúngicos no interior do ambiente e controlar as infecções hospitalares.

Sendo a avaliação da qualidade do ar de ambiente internos um parâmetro essencial para o monitoramento de possíveis infecções provenientes do ambiente hospitalar, principalmente em áreas críticas, cujo os pacientes estão sujeitos a exposição de patógenos do ar, de instrumentos, de equipamentos ou das mãos dos profissionais da saúde.

Contudo, as pesquisas que visem o isolamento e identificação de microrganismos de fontes ambientais além dos estudos sobre a resistência desses microrganismos a antibióticos ou antifúngicos pode responder aos questionamentos sobre os surtos de infecções hospitalares.

## 9.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMCZYK, M. L. Infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva. In: BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Pediatria: Prevenção e controle de infecções hospitalar*. Brasília: Ed. ANVISA, 2006. 116p.

ADDINGTON, M. C. History and future of ventilation. In: SPENGLER, J. D., SAMET, J., M., MCCARTHY, J. F. *Indoor Air Quality Handbook*. New York: MacGraw-Hill, 2004. 1448p.

AFONSO, M. S. M.; SOUZA, A. C. A.; TIPPLER, A. F. V.; et al. Condicionamento de ar em salas operação e controle de infecção. **Revista Eletrônica de Enfermagem**. v. 8, n. 1, p. 134-146, 2006. Disponível em: [http://www.fen.ufg/revista/revista81\\_revisao\\_01.htm](http://www.fen.ufg/revista/revista81_revisao_01.htm). acessado em 28 de outubro de 2008.

ALBERTI, C.; BOUAKLINE, A.; RIBAUAD, P. et al. Relationship between environmental fungal contamination and the incidence of invasive aspergillosis in haematology patients. **Journal of hospital Infection**. v. 48, p. 198-206, 2001.

ALEXOPOULOS C. J, MIMS C. W & BLACKWELL M. 1996. **Introductory Mycology**. 4th ed. New York, John Wiley & Sons. 869 p.

ALMEIDA, M. F.; NOVAES, H. M. D.; ALENCAR, G. P.; et al. Mortalidade neonatal no Município de São Paulo: influência do peso ao nascer e fatores sócio-demográficos e assistenciais. **Rev. Brasileira Epidemiologia**; v.5, p. 93-107, 2002.

ALVAREZ-LERMA, F.; NOLLA-SALAS, J.; LEON, C.; et al. Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. **Intensive Care Medicine**. v. 29, p.1069-1076, 2003.



ANDRADE, D.; ANGERAMI, E. L.; PADOVANI, C. R. Condição microbiológica dos leitos hospitalares antes e depois de sua limpeza. **Rev. Saúde Pública**, v. 34, nº 2, p.163-9, 2000.

ANG, B. S.P.; TELENTI, A.; KING, B.; et al. Candidemia from urinary tract source: microbiological aspects and clinical significance. **Clinical Infectious Diseases**. v. 17, p. 622-627, 1993.

AUDOGLDU, H.; ASAN, A.; OTKUN, M. T.; TURE, M. Monitoring of fungi and bacteria in the indoor air of primary schools in Edirne City, Turkey. **Indoor and Built Environment**. v. 14, p. 411-425, 2004.

AYLIFFE, G. A. J. Principios para la desinfección en un hospital. **Laboratorio**. V. 78, p. 223-235, 1984.

BALLEY J.L.; ELLIS, F. J. Neonatal candidiasis: ophthalmologic infection. **Semin Perinatol**. v. 27, p. 401-405, 2003.

BEAUMONT, F.; KAUFFMAN, H.F.; DE MONCHY, J. G. R.; et al. Volumetric aerobiological survey of conidial fungi in northeast Netherlands. **Allergy**. v. 40, p. 181-186, 1985.

BECK-SAGUÉ, M. C.; JARVIS, W. R. Secular trends in the epidemiology of nasocomial fungal infections. **Journal Infection Disseminated**, v. 5, p. 1247-1251, 1993.

BERNARDI E; NASCIMENTO J. S. Fungos anemófilos na praia do Laranjal em Pelotas, RS. SP. **Arq. Instituto Biologia**, v. 72, n.1, p.93-97,2005.

BERNARDS, A. T.; FRÉNAY, H. M. E.; LIM, B. T.; et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*: an unexpected difference in epidemiologic behavior. **American Journal of Infection Control**. v. 26, p. 544-551, 1998.

BERQUÓ, L. S.; BARROS, A., J., D.; LIMA R. C. et al. Utilização de medicamentos para o rastreamento de infecções respiratórias na comunidade. **Rev. Saúde Pública**. v. 38, n. 3, p. 358-364. 2004.

BINELLI, C.A.; MORETTI, M.L.; ASSIS, R.S.; et al. Investigation of the possible association between nosocomial candiduria and candidaemia. **Clinical Microbiology and Infection**. v.12, p. 538-543, 2006.

BRASIL. Ministério da saúde. Consulta Pública nº. 109, de 11 de dezembro de 2003. Proposta de Resolução que Dispõe sobre Indicadores da Qualidade do Ar Ambiental Interior em Serviços de Saúde. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/scriptsweb/consultapublica/consultapaginado.asp?an0=2003>. Acessado em 03 de julho de 2007a.

\_\_\_\_\_. Resolução - RE nº. 176, de 24 de outubro de 2000. Orientação Técnica elaborada por Grupo Técnico assessor sobre Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo, Diário Oficial da União, Brasília, p. 35-37, 20 de janeiro de 2003b.

\_\_\_\_\_. Resolução - RE nº. 09, de 16 de janeiro de 2003. Orientação Técnica revisada contende Padrões da Qualidade do Ar Interior em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo, Diário Oficial da União, Brasília, p. 35-37, 20 de janeiro de 2003c.

\_\_\_\_\_. Portaria nº. 3.523 de 28 de agosto de 1998. Regulamento Técnico contendo medidas básicas referentes aos procedimentos de verificação visual do estado de limpeza, remoção sujidades por métodos físicos e manutenção dos estados de integridade e eficiência de todos os componentes dos sistemas de climatização, para garantir a Qualidade do Ar de Interiores e prevenção de riscos a saúde de seus ocupantes de ambientes climatizados. Diário Oficial da União, Brasília, p. 40-42, 31 de agosto de 1998d.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.616, de 12 de maio de 1998. Dispõe sobre as diretrizes e normas para prevenção e controle de infecções hospitalares. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 1998. Seção 1, p. 133-135.1998e.

BURTON, G. R. W. ENGELKIRK, P. G. **Microbiologia para as ciências da saúde**, 7ª Ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 426p.

BOUZA, E.; SAN JUAN, R.; MUNOZ, P.; VOSS, A.; KLUYTMANS, A. European perspective on nosocomial urinary tract infections II. Report on incidence, clinical characteristics and outcome. **Clin. Microbiol. Infect.** v. 10, p. 532-542, 2001.

BUSH, R. K.; PORTNOY, J. M.; SAXON, A.; et al. The medical effects of mold exposure. **Journal Allergy Clinical Immunology**. v. 117, p. 326–333, 2006.

CALIL, R.; ROLA, G. M. F.; RICHTMANN, R. Infecções Hospitalares em neonatologia. In: BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Pediatria prevenção e controle de infecção hospitalar. Brasília: Editora Anvisa, 2006. 116p.

CANO, M.V.; PERZ, J. F.; CRAIG, A. S.; et al. Candidemia in pediatric outpatients receiving home total parenteral nutrition. **Medical Mycology**, v. 43, n. 3, p. 219-225, 2005.

CANTÓN, E.; VIUDES, A.; PEMÁN, J. Infección sistémica nosocomial por levaduras. **Rev. Iberoamerica Micologia**, v. 18, n. 2, p. 51-55, 2001.

CARDENES, C. D.; CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; ARIAS, A.; et al. Comparative evaluation of four commercial tests for presumptive identification of *Candida albicans*. **Journal Microbiol. Methods**, v. 59, n. 2, p. 293-297, 2004.

CARMO, E. S.; BELÉM, L. F.; CATÃO, R. M. R.; et al. Microbiota fúngica presente em diversos setores de um hospital em Campina Grande-PB. **RBAC**, v. 39, p. 213-216, 2007.

CARVALHO, M.; GOMES, M. A. A mortalidade do prematuro extremo em nosso meio: realidade e desafios. **Journal de Pediatric**. v 81, p. 111-118, 2005.

CIRAK, M. Y.; KALKANCI, A.; KUSTIMUR, S. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 98, p. 1027-1032, 2003.

CAMPBELL, C., K. DAVEY, K. G.; HOLMES, A. D. et al. Comparison of the API *Candida* system with the AUXACOLOR system for identification of common yeast pathogens. **Journal Clin. Microbiol**. v. 37, n. 3, p. 821-823, 1999.

COMISSÃO DE CONTROLE DE INFECÇÕES (CCH). Limpeza e desinfecção de superfícies em serviços de saúde, 2006. Disponível em: <http://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/ssauade/comissao/desin/i16limpdesinfecsuperficie.pdf>. Acessado em 12 de dezembro de 2008.

CHEN, Y. C.; EISNER, J. D.; KATTAN, M.M. et al. Identification of medically important yeast using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed space 2 region of the rDNA genes. **Journal Clin. Microbiol**, v. 38, p. 2302-2310, 2001.

COLOMBO, A. L.; Epidemiology and treatment of hematogenous candidiasis: a Brazilian perspective. **Braz. Journal infect. Diseases**. v. 4, p. 113-138, 2003.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2000.

CORNET, H.; LEVRY, V.; FLEURY, L.; LORTHOLARY, J.; et al. Efficacy of prevention by high-efficiency particulate air filtration or renovation airflow against *Aspergillus* airborne contamination during hospital renovation. **Infect. Control. Hospital Epidemiology**, v. 20, p. 508-513, 1999.

DE MORAES, B. A.; CRAVO, C. A. N.; LOUREIRO, M. M.; et al. Epidemiological analysis of bacterial strains involved in hospital infection in a University Hospital from Brazil. **Instituto de Medicina Tropical**. v. 42, p. 201-207, 2000.

DEARBORN, D. G. I.; YIKE, W. G.; SORENSON, M. J.; et al. An overview of the investigations into pulmonary hemorrhage among infants in Cleveland, Ohio. **Environ. Health Perspect. Suppl.** v. 107, p. 495–499, 1998.

DEB, S.; KHAN, A.K.; DEBASISH, B.; et al. Intracranial necrotizing granuloma caused by *Cladophialophora bantiana*. **Neurology India**. v. 53, p. 335-336, 2005.

DINIZ, J.N.M.; SILVA, R.A.M.; MIRANDA, E.T. et al. Monitoramento de fungos anemófilos e de leveduras em unidade hospitalar. SP. **Rev. Saúde Pública**, v. 39, n.3, p.398-405, 2005.

DIXIT, A.; LEWIS, W.; BATY, J.; CROZIER, W.; WEDNER, J. Deuteromycete aerobiology and skin-reactivity patterns – a two year, concurrent study in Corpus Christi, Texas, USA. **Grana**. v. 39, p. 209-218, 2000.

DOCTOR FUNGOS – All Rights Reservad<sup>©</sup> 2006 Copyright e Privacy Policy. Disponível em: <http://www.doctorfungus.org/> acessado em: 24 de outubro de 2008.

DUTRA, L. M. M. **Microbiota fúngica em ambientes climatizados artificialmente antes e após a higienização**. Dissertação de Mestrado-Instituto de Ciências Biomédicas. 2002. 72p.

Eggimann, P.; Pittet, D. Infection Control in the ICU. **Chest Journal**. v. 120, nº 6 p. 2059-2093, 2001.

EIRCKHOFF, T. C. “Airbone Nasocomial Infection: a conteporary” **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 15, p. 663-672, 1994.

ELEWSKI, B. E. Superficial mycosis dermatophytoses and selected dermatomycose. In: ELEWISK, B. E. **Topics in clinical dermatology cutaneous fungi infectins**. New York: Lgaku-shoin, 1992.

ELIDEMIR, O.; COLASURDO, G. N.; ROSSMANN, S. et al. Isolation of *Stachybotrys* from the lung of a child with pulmonary hemosiderosis. **Pediatrics**. v. 102, p. 964–966, 1999.

FANELLO, S.; BOUCHARA, J.P.; JOUSSET, N. et al. Nosocomial *Candida albicans* acquisition in a geriatric unit: epidemiology and evidence for person-to-person transmission. **Journal Hospital Infection**. v. 47, p. 46-52, 2001.

FERRARI, L. S. L.; BRITO, A. S. J.; CARVALHO, A. B. R.; et al. C. Mortalidade neonatal no Município de Londrina, Paraná, Brasil, nos anos 1994, 1999 e 2002. **Cad. Saúde Pública**. v. 22, p.1063-1071, 2006.

FISHER, J.F. Candiduria: when and how to treat it. **Current Infectious Diseases Report**. v. 2, p. 523-530, 2000.

FLAPPAN, S. M.; PORTNOY, J.; JONES, P.; et al. Infant pulmonary hemorrhage in a suburban home with water damage and mold (*Stachybotrys atra*). **Environ. Health Perspect**. v.107, p. 927-930, 1999.

FLAHERT, J. P.; WEINSTEIN, R. A. Nosocomial infection caused by antibiotic-resistant organisms in the intensive-care unit. **Infect. Control Hosp. Epidemiol**. v. 17, n. 4, p. 236-245, 1996.

FOXMAN, B. Epidemiology of Urinary Tract Infections. Incidence, Morbidity, and Economic Cost. **The American Journal of Medicine**, v.113, n.1, p.6-10, 2002.

FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies,

fatores de risco e susceptibilidade aos anfifúngicos. **Rev. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41, n. 1, p. 23-28, 2008.

GAMBALE, W.; CROCE, J.; MANSO, E. R. C.; et al. Library fungi at the University of São Paulo and their relationship with respiratory allergy. **J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.** v. 3, p. 45-50, 1993.

GARDAM, M.A.; BUROWS, L.L.; KUS, J.V.; et al. Surveillance of infection in neonatal intensive care units. **Early Hum Dev.** v. 83, p. 157-163, 2007.

GRAUDENZ, G. S.; KALIL, J; LATORRE, M. R. et al. Exposição alergênica e sintomas respiratórios em ambientes climatizados. SP. **Rev. Bras. Alergia Imunopatologia.** v. 27, n. 3, p.94-102, 2004.

GAY, J. W. Surveillance of infection in neonatal intensive care units. **Early Hum Dev.** v. 83, p. 157-163, 2007.

GODOY, P.; TIRABOSCHI, I.N.; SEVERO, L. C.; et al. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp bloodstream isolates from Latin American hospitals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 98, n. 3, p. 401-405, 2003.

GOLDMANLN, D. Bacterial colonization and infection in the neonate. *The American Journal of Medicine*, New York, US: Yorke Medical Group, v.70, n. 2, p. 417-422, 1981.

GORBACH, S. L.; BARLETT, J. G. E.; BLACKLOW, N. R. **Infectious diseases**, 3° Ed. Amsterdam: Lippincott Williams e Wilkins, 2003. 2700p.

GRUMACH, A. S. **Alergia e imunologia na infância e na adolescência**. São Paulo: Atheneu, 2001, p. 42-47.

GUBBINS, P. O.; PISCITELLI, S. C.; DANZIGER, L. H.; Candidal urinary tract infections: a comprehensive review of their diagnosis and management. **Pharmacotherapy.** v.13, p.110-127, 1993.

GUILLAMÓN, J. M.; SABATÉ, J.; BARRIO, E. et al. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. **Arch Microbiol.** V. 169, p. 387-392, 1998.

GUERREIRO R. T.; SILVEIRA R. M. B. **Glossário Ilustrado de Fungos: termos e conceitos aplicados à micologia.** 2ª ed., Editora Universidade/UFRGS, 2003, 102p.

HALWAGY, M. H. Seasonal airspora at three sites in Kuwait 1977–1982. **Mycological research.** v. 93, p.208-213, 1989.

HARAKEH, S.; YASSINE, H.; GHARIOS, M.; et al. Isolation, molecular characterization and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from meat based fast food in Lebanon. **Scienc Total Environ**, v. 341, n.º 1-3, p. 33-44, 2005.

HARRIS, J. S. Pediatric nosocomial infections: children are not little adults. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, Thorofare, NJ, US: C. B. Slack, v.18, n.11, p. 739-742, 1997.

HAWKSWORTH D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revised. **Mycological Research.** v. 105, n. 12, p. 1422-1432, 2001.

HIRONAKA, H. C.; CASANOVA, L. D. Concentrações séricas de imunoglobulinas em sangue do funículo umbilical e em sangue materno no momento do parto. **Acta cirúrgica Brasileira.** v. 18, p. 159-156, 2003.

HOFFMAN, P. N.; BENNETT, A. M.; SCOTT, G. M. Controlling airborne infections. **Journal of Hosp. Infect.**, v. 43 Suppl., p. 203-210, 1999.

HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J. FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi.** CBS: Spain. 2000. 1126p.



HOTA B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are the hospital surface reservoirs for nosocomial infection? **Clinical Infectious Diseases**. v. 39, p. 1182-1189, 2004.

HUANG, C.; LEE, C. L. F.; MA, Y.; SU, H. J. The seasonal distribution of bioaerosols in municipall and fillsites: a 3-yr study. **Atmospheric Environment**. v. 36, n. 1, p. 4385-4395, 2002.

HSU, M. C.; CHEN, K. W.; LO, H. J. L. et al. Species identification of medically important fungi use of real-time ighthcycler PCR. **Journal Med. Microbiol.**, v. 52, p. 1071-1076, 2003.

HUMPHREY, H. Microbes in the air - Whem to count! (The role of air sampling in hospital). **Journal Med. Microbiol.**, v. 37, p. 81-82, 1998.

JAWETS, E. **Micologia Médica**. 20 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, p.253-270.

JENSEN, P. A.; SCHAFFER, M. P. Sampling and characterization of bioaerosols. Manual of analytical Methods. Disponivel em: <http://www.cdc.gov/niosh/nmam/pdfs/chapter-j.pdf>. Acessado em 17 de janeiro de 2009.

JONES, A., P. Indoor air quality and health. **Atmospheric Environment**. v.33. n. 1, p. 4535-4564, 1999.

JOHANNESSEN, L. N.; NILSEN, A. M.; LOVIK, M. Mycotoxin-induced depletion of intracellular glutathione and altered cytokine production in the human alveolar epithelial cell line A549. **Toxicology letters**. v.168, p. 103-112, 2007.

KAUFFMAN, C. A. Candiduria. **Clinical Infectious Diseases**. v. 41, p. 371-376, 2005.

KAUFFMAN, C. A.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D.; et al. Prospective

multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. **Clinical Infection Dis.** v. 30, n. 1, p. 14-18, 2000.

KENDRICK B. 2008. **The Fifth Kingdom Mycologue Publications.** Disponível em: <http://www.mycolog.com/fifhtoc.html>. acessado em 12 de junho de 2008.

KOBAYASHI, C.C.; FERNANDES, O. F.; MIRANDA, K. C.; SOUSA, E. D.; SILVA, M. R. Candiduria in hospital patients: a study prospective. **Mycopathologia.** v. 158, p. 49-52, 2004.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia Médica.** 8ªed. São Paulo: Editora Sarvier, 695p, 2002.

LEENDERS, A. C. A. P.; BELKUM, A.; BEHRENDT, M.; LUIJENDIJK, A. D.; VERBRUGH, H. A.; Density and molecular epidemiology of *Aspergillus* in air and relationship to outbreaks of *Aspergillus* infection. **Journal Clinical Microbiology.**, v. 37, n. 6, p. 1752-1757, 1999.

LI, C.; KUO, Y. Airbone characterization of fungi indoors and outdoors. **Journal of Aerosol Science,** v.23, n.1, p.667-670, 1992.

LIZIOLI, A.; PRIVITERA, G.; ALLIATA, E.; BANFI, E. M. A. Prevalence of nosocomial infections in Italy: result from the Lombardy survey in 2000. **Jounal Hospital Infection.** v. 54, p.141-148, 2003.

LOPES, O.G. *Conforto térmico e qualidade do ar em ambientes* 2004. [online]. Disponível em: <http://cursos.unisantabr/mecanica/polari/ct-og.pdf> Acesso em: 12 de junho de 2008.

LUGAUSKAS, A.; KRIKSTAPONIS, A.; Filamentous fungi insoleted in hospitals and same medical institutions in Lithuania. **Indoor and Built Environment.** v.13, p. 101-108, 2004.

LUNDSTROM T, SOBEL J. Nosocomial candiduria: a review. **Clinical Infectious Diseases**. v.32, p. 1602-1607, 2001.

LUO, G.; MITCHELL, T. G. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. **Journal Clinical Microbiol.**, v. 40, p. 2860-2865, 2006.

LUOMA, M. e BATTERMAN, S. A. Characterization of particulate emissions from occupant activities in offices. **Indoor Air**. v. 11, p. 35-48, 2001.

LUCCHETTI, G.; SILVA, A. J.; UEDA, S. M. Y.; et al. Infecções do trato urinário: análise da frequência e do perfil de sensibilidade dos agentes causadores de infecções do trato urinário em pacientes com cateterização vesical crônica. **J. Bras. Patol. Lab.**v. 41, nº 6, p. 383-389, 2005.

MCCULLOUGH, M. J.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. **J. Clin. Microbiol.** v. 37, n. p. 417-421, 1999.

MACHADO, C. J.; HILL, K. Determinantes da mortalidade neonatal e pós-neonatal no Município de São Paulo. **Rev. Bras. de Epidemiol.**, v. 6, p. 345-58, 2003.

MAHNSS, B.; STEHR, F.; SCHÄFER, W.; et al. Comparison of standard phenotypic assays with a PCR method to discriminate *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **Mycoses**. v. 48, n. 1, p. 55-61, 2005.

MALUCHE, M. E.; SANTOS, J. I. *Candida* sp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **RBAC**, v. 40, n. 1. p. 65-67, 2008.

MALUF, M. E. Z.; MALDONADO, A. F.; BERCIAL, M. E.; PEDROSA, S. A. A. Stethoscope a friend or a enemy? **Jornal de medicina de São Paulo**, v. 120, n. 1, p. 13-15, 2002.

MARTINS, E. F.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. Determinantes da mortalidade neonatal a partir de uma coorte de nascidos vivos, Montes Claros, Minas Gerais, 1997-1999. **Rev. Bras. Saúde Materna Infant.** v.; 4, p. 405-12, 2004.

MARTINS-DINZ J. N.; SIVA, R. A. M.; MIRANDA, E. T.; et al. Monitoramento de fungos anemófilos e de leveduras em unidade hospitalar. **Rev. Saúde Pública.** v. 39, p. 398-405, 2005.

MATSUMOTO, F. E.; GANDRA, R. F.; RUIZ, L. S.; et al. Yeasts isolated from blood and catheter in children from a public hospital of Sao Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 154, n. 2, p. 63-69, 2002.

MCDONALD, L. C.; WALKER, M.; CARSON, L.; ARDUINO, M. et al., Outbreak of *Acinetobacter* spp. Bloodstream infection in a nusey associated with contaminated aerosols and air conditioners. **Pediatr. Infect. Dis. Journal**, v. 17, p. 716-722, 1998.

MCGOWAN, Jr.; JOHN, E. Economic impact of antimicrobial resistance. **Emerging Infection Diseases.** v. 7, p.286-292, 2001.

MEDRELA-KUDER, E. Seasonal variations in the occurrence of culturable airborne fungi in outdoor and indoor air in Craców. **International Biodeterioration & Biodegradation.** v.52, p.203-205, 2003.

MENEZES, A. E.; ALCANFOR, A. C.; CUNHA, F. A . Fungos anemófilos na sala de periódicos da biblioteca de ciências da saúde da Universidade Federal do Ceará. **RBAC**, V. 38, p. 155-158, 2006.

MEZZARI, A.; PERIN, C.; JUNIOR, S.A.S.; et al. Fungos Anemófilos e Sensibilização em Indivíduos Atópicos em Porto Alegre. **Rev. Inst. Medicina Tropical** . v. 44, p. 269-272, 2002.

MIRHEND, H.; MAKIMURA, K.; KHORAMIZADREZA, M.; et al. One-enzyme PCR-RFLP assay for identification of six medically important *Candida* species. **J. Medic. Mycol.**, v. 47, p. 225-229, 2006.

MORBIM, M.; SALMITO, A. M. Microbiota fúngica dos condicionadores de ar nas unidades de terapia intensiva de Teresina, PI. **Rev. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p.556-559, 2006.

MURTONIEMI, T.; PENTTINEN, P.; NEVALAINEN, A.; et al. Effects of microbial cocultivation on inflammatory and cytotoxic potential of spores. **Inhal. Toxicol.** v. 17, p. 681–693. 2005.

MOSCATO, U. Hygienic management of air conditioning systems. **Societa Editrice Universo**. supl. 02, n. 12, p. 249 – 54, 2000.

NAGATA, E.; BRITO, A. S. J.; TIEMI, M. Nasocomial infections in a neonatal intensive care unit: incidence and risk factors. **American Journal of Infection Control**. v. 30, p. 26-30, 2002.

NASSAL, D., YASIN, S.; ABU-ELTEEN, K. A rapid PCR-based method for identification of four important *Candida* species. **New Microbiology**. v. 28, p. 245-250, 2005.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. **NCCLS** document M-27 A2. Wayne PA, 2002.

NAVARRO, E. E.; ALMARIO, J. S.; SCHAUFLE, R. R.; BACHER, J.; WALSH, T. J. Quantitative urine cultures do not reliably detect renal candidiasis in rabbits. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, p. 3292-3297, 1997.

NEUFELD, P. M., **Manual de Micologia Médica-Técnicas Básicas de Diagnóstico**. 1ªed. Rio de Janeiro: Editora PNCQ, 1999.

NUNES, Z. G. **Estudo da Qualidade Microbiológica do ar de ambientes internos climatizados**. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz. 2005, 143 p.

OLIVEIRA, A. C.; WERTI, A.; PAULA, A. Q. et al. Infecções hospitalares em uma unidade de internação. **Enfermagem UFPE On line**. v. 1, p. 189-191, 2007.

OLIVEIRA, R. D.; MAFFEI, C. M.; MARTINEZ, R. Nosocomial urinary tract infections by *Candida* species. **Revista da associação médica Brasileira**. v. 47, p. 231-235, 2001.

OLESEN, B., W., International standards for the indoor environment. **Indoor Air**. v. 14, n. Suppl. 7, p. 18-26, 2004.

OREN, I.; HADDAD, N.; FINKELSTEIN, R.; ROWE, J. M. Invasive pulmonary aspergiloses in neutropenic patients during hospital construction: before and after chemoprophylaxis and institution of HEPS filters. **American Journal of Hematology**. v. 66, p. 257-262, 2001.

OTCENASEK, M.; DUORACK, J. **Pictorial dictionary of medical mycology**. The Hague: Dr W. Junk, 1973, 229p.

PFALLER, M. A.; DIEKERNA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, n 1, p. 133-163, 2007.

PANNUTI, C. S. A importância do ambiente hospitalar. In: Rodrigues, E. A. C. et al. **Infecções Hospitalares: Prevenção e Controle**. São Paulo: Savier; 1997. p. 449-454.

PASQUARELLA, C. PITZURRA, O. SAVINO, A. The index of microbial air contamination. **Journal of hospital infection**. v. 46, n. 4. p. 241-256, 2000.

PASSOS, X. S.; SALES, W.S.; MACIEL, P. J.; et al. *Candida* colonization in intensive care unit patients' urine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.100, p.925-928, 2005.

PEI-CHIN, W.; HUEY-JEN, S.; CHIA-YIN, L. Characteristics of indoor and outdoor airborne fungi at suburban and urban homes in two seasons. **The Science of the Total Environment**, v. 253, n. 2, p. 111-118, 2000a.

PEI-CHIN, W.; HUEY-JEN, S.; HSIAO-MAN, H. A. A comparasion of sampling media for environmental viable fungi collection in a hospital environment. **Environment research. Section A**, v. 82, n.4, p.253-257, 2000b.

PEREIRA, R. G.; REIS, D.; AMBRÓSIO JUNIOR, G. N.; et al. Bioaerossóis bacterianos em um hospital. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. V. 26, n.1, p. 77-81, 2005.

PERFECT , J. R.; COX, G. M.; LEE, J. Y.; et al.. The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergiloses. **Clinical Infectious Diseases**., v. 33, p. 1824-1833, 2001.

PFALLER, M. A.; Nasocolmial candidiasis: emergging species, reservoirs, and modes of transmission. **Clinical Infectious Diseases**. v. 22 (Suppl 2), p. 89-94, 1996.

PRADE, S.S.; OLIVEIRA, S.T.; RODRIGUES, R.; et al. Estudo brasileiro da magnitude de infecção hospitalar em hospitais terciários. **Revista do Controle de Infecção Hospitalar**. v. 2, p.11-24, 1995.

RAMPLING, A.; WISEMAN, S.; DAVIS, L. et al. Evidence that hospital hygiene is important in the control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal Infection Sociedade**. v. 49, p. 109-116, 2001.

RAMOS, S. R. T. S. **Gravidade de doenças à admissão e mortalidade intra-hospitalar em unidade neonatal de cuidados intensivos em São Paulo** (livre-docência) São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2000 164p.

RAVEN P. H, EVERT R. F; EICHHORN S. E. **Biologia Vegetal**. 7º ed. Editora Guanabara Koogan Rio de Janeiro, 2007.

REBELL, G.; TAPLIN, D. Dermatophytes: their recognition and identification. Miami: **Revised**. 1974.124p.respiratory allergens to 42 allergenic extracts of airborne fungi isolated in São Paulo, Brasil. **Allergol. Immunopathology**. v.16, p. 397-402, 1988.

REPONEN, T., K.; WILLEKE, V.; ULEVICIUS, V. et al. Techniques for dispersion of microorganisms into air. **Aerosol Science Technol**. v. 27, p. 405-421, 1996.

RIDDEL, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycology**. v. 42, p. 265-270, 1950.

RODRIGUES, C. P.; MONTELLI, A. C.; RUIZ, L. S. et al. Infecções hospitalares fúngicas: experiência em um hospital público de São Paulo. **Prática Hospitalar**. v. 9, n. 52, p. 63-66, 2007.

ROILIDES, E.; FARMAKI, E.; EVDORIDOU, D.J., et al. Neonatal candidiasis: analysis of epidemiology, drug susceptibility, and molecular typing of causative isolates. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v. 23, p. 745-750, 2004

SALOMON, G. M.; KOSKI, M. H.; ELLMAN, M. R.; et al. Airborne mold and endotoxin concentrations in New Orleans, Louisiana, after flooding, October through November 2005. **Environmental Health Perspectives**. v. 114, p.1381-1386, 2006.

SAN MIGUEL, L.G.; COBO, J.; OTHEO, E.; et al. Secular trends of candidemia in a large tertiary-care hospital from 1988 to 2000: emergence of *Candida parapsilosis*. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 26, p. 548-552, 2005.



SAVINO, E.; CARETTA, G. Airborne fungi in an Italian rice mill. **Aerobiologia**. v. 44, n. 8, p. 267–274, 1992.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. C. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 388.

SILVA FILHO, G. N.; OLIVEIRA, V. L. **Microbiologia: Manual de aulas práticas**, 2º Ed. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007. 157p.

SILVEIRA, M. G.; **Avaliação da qualidade do ar em um aeroporto na cidade do Rio de Janeiro**. RJ. Tese (Doutorado). Escola de Saúde Pública do Rio de Janeiro, p.151, 2001.

SIQUEIRA, L. F. Síndrome do edifício doente, o meio ambiente e a infecção hospitalar. In FERNANDES, A. T. et al. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**, Rio de Janeiro: Atheneu, 2000. cap.72, p.1307-22.

SMITH, P. B.; STEINBACH, W. J.; BENJAMIN, D. K. Jr. Neonatal Candidiasis. **Infectious disease clinics of North America**. v. 19, n. 3, p. 603-615, 2005.

SOBEL, J .D. Controversies in the diagnosis of candiduria: what is the critical colony count. Current Treatment Options. **Infectious Diseases**. v. 4, p.81-83, 2002.

SPENGLER, J. D.; CHEN, Q. Y.; KUMKUM, M.; Indoor air quality factors in designing healthy buildings. **Indoor quality handbook**. New York: McGraw-Hill, 2004, 1448.

ST-GERMAIN, G.; LAVERDIERE, M.; PELLETIER, R. et al. Prevalence and antifungal susceptibility of 442 *Candida* isolates from blood and other normally sterile sites: results of a 2-year (1996 to 1998) Multicenter Surveillance Study in Quebec, Canada. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, p. 949-953, 2001.

STRAUZ, M. C.; **Análise de um acidente fúngico na Biblioteca Central de Manginhos**. RJ. Tese. Apresentada a Escola de Saúde Pública. p.79, 2001.

STRELING, T. D.; COLLET, C.; RUMEL, D. A. Epidemiologia dos edificios doentes. **Revista de Saúde Pública**. v. 1,n. 25, p. 56-63, 1991.

TAKAHASHI, T. Airborne fungal colony-forming units in outdoor and indoor environments in Yokohama, Japan. **Mycopathology**. v. 139, p. 23–33, 1997.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. Ed, Porto Alegre: Artmed, 2005, 894p.

TRICK, W. E.; SCHONIAN, G.; MEYER, W.; et al. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. **Clinical Infectious Diseases**. v. 3, p. 627-630, 2002.

TURRINI, R. N. T.; SANTOS, A. H.; Infecções hospitalares e causas múltiplas de morte. **Jornal de Pediatria**. v. 78, p. 485-490, 2002.

VAZQUEZ, J.A.; SANCHEZ, V.; DMUCHOWSKI, C.; et al. Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: an epidemiology study. **Journal of Infectious Diseases**. v. 168, p. 195-201, 1993.

VERWEIJ, P. E.; BREUKER, I. M.; RIJS, A. J. et al. Comparative study of seven commercial yeast identification systems. **Journal Clinical Microbiology**. v. 52, n. 4, p. 271-273, 1999.

WAHYUNINGSIH, R.; FREISLELEBEN, H. J.; SONNTAG, H. G.; et al. Simple and rapid detection of *Candida albicans* DNA in serum by PCR for diagnosis of invasive candidíasis. **Journal Clinical Microbiology**. v. 38, n. 8, p. 3016-3021, 2000.

WANKE, B.; LAZÉRA, M.S.; NUCCI, M. Fungal infections in the immunocompromised host. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.95, p.153-158, 2000.

WEINBERGGER, M.; SWEET, S.; LEIBIVICI L.; et al.. Correlation between candiduria and departmental antibiotic use. **Journal of Hospital Infection**. v. 53, p. 183-186, 2003.

WENZEL, R. P. Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. **Clinical Infectious Diseases**. v. 20, p. 1531-1534, 1995.

WHITE, T. J.; BURNS, T.; LEE, S.; et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p.315–322. *In* M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), PCR protocol: a guide to methods and applications. **Academic Press**, Inc., New York, NY. 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Journal Clinical Microbiology**. v. 33, p. 2476-2479, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Indoor Air Quality. Disponível: [http:// www.who.int/indoorair/en/](http://www.who.int/indoorair/en/). Acessado em: 21 de setembro de 2008.

ZAIDI, A. K. M.; HUSKINS, W. C.; THAYER, D.; et al. Hospital - acquired neonatal infections in developing countries. *Lancet*, London, GB: **Lancet Publications**, v. 365, n. 9465, p.1175-1188, 2005.

ZANCONATO, R. V.; PEREIRA, W. K. V.; ABEGG, M. A. Condições microbiológicas de colchões antes e após a sua desinfecção. **Prática Hospitalar**. v. 9, n. 52, p. 68-72, 2007.

ZAOUTIS, T. E.; ARGON, J.; CHU, J.; et al. The Epidemiology and Attributable Outcomes of Candidemia in Adults and Children Hospitalized in the United States: A Propensity Analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, p. 1232-1239, 2005.

**10 ANEXOS****10.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa****UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Maceió – AL, 17/04/2007

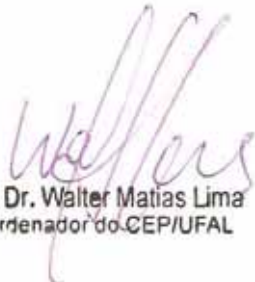
Senhor (a) Pesquisador (a), Aryanna Kelly Pinheiro Souza

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), reunido em 16/04/2007 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº **016604/2006-12** sob o título **Caracterização de fungos anemófilos isolados da UTI neonatal climatizada e dos recém-nascidos atendidos no HU/UFAL**, de sua autoria, vem por meio deste instrumento comunicar sua aprovação com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

Outrossim, recomendamos a observância do que consta na folha de rosto com respeito ao cumprimento dos prazos para entrega de relatórios, bem como o atendimento da referida Resolução da CONEP/CNS, quando for o caso (\*).

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra referidas.

(\*) Áreas temáticas especiais

  
Prof. Dr. Walter Matias Lima  
Coordenador do CEP/UFAL

## 10.2 Resolução - RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003.

**O Diretor da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, no uso da atribuição que lhe confere a Portaria nº 570, do Diretor Presidente, de 3 de outubro de 2002;

Considerando o § 3º, do art. 111 do Regimento Interno aprovado pela Portaria n.º 593, de 25 de agosto de 2000, republicada no DOU de 22 de dezembro de 2000,

Considerando a necessidade de revisar e atualizar a RE/ANVISA nº 176, de 24 de outubro de 2000, sobre Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior em Ambientes Climatizados Artificialmente de Uso Público e Coletivo, frente ao conhecimento e a experiência adquirida no país nos dois primeiros anos de sua vigência; considerando o interesse sanitário na divulgação do assunto;

Considerando a preocupação com a saúde, a segurança, o bem-estar e o conforto dos ocupantes dos ambientes climatizados;

Considerando o atual estágio de conhecimento da comunidade científica internacional, na área de qualidade do ar ambiental interior, que estabelece padrões referenciais e/ou orientações para esse controle;

Considerando o disposto no art. 2º da Portaria GM/MS n.º 3.523, de 28 de agosto de 1998;

Considerando que a matéria foi submetida à apreciação da Diretoria Colegiada que a aprovou em reunião realizada em 15 de janeiro de 2003, **resolve**:

Art. 1º Determinar a publicação de Orientação Técnica elaborada por Grupo Técnico Assessor, sobre Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior, em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo, em anexo.

Art. 2º Esta Resolução entra em vigor na data de sua publicação.

CLÁUDIO MAIEROVITCH PESSANHA HENRIQUES

ANEXO

ORIENTAÇÃO TÉCNICA ELABORADA POR GRUPO TÉCNICA ASSESSOR  
SOBRE PADRÕES REFERENCIAIS DE QUALIDADE DO AR INTERIO R EM  
AMBIENTES CLIMATIZADOS ARTIFICIALMENTE DE USO PÚBLICO E  
COLETIVO

I – HISTÓRICO

O Grupo Técnico Assessor de estudos sobre Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo, foi constituído pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, no âmbito da Gerência Geral de Serviços da Diretoria de Serviços e Correlatos e instituído por membros das seguintes instituições:

Sociedade Brasileira de Meio Ambiente e de Qualidade do Ar de Interiores/BRASINDOOR, Laboratório Noel Nutels Instituto de Química da UFRJ, Ministério do Meio Ambiente, Faculdade de Medicina da USP, Organização Panamericana de Saúde/OPAS, Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho – FUNDACENTRO/MTb, Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade Industrial/INMETRO, Associação Paulista de Estudos e Controle de Infecção Hospitalar/APECIH e, Serviço de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde/RJ, Instituto de Ciências Biomédicas – ICB/USP e Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Reuniu-se na cidade de Brasília/DF, durante o ano de 1999 e primeiro semestre de 2000, tendo como metas:

1. estabelecer critérios que informem a população sobre a qualidade do ar interior em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo, cujo desequilíbrio poderá causar agravos a saúde dos seus ocupantes;
2. instrumentalizar as equipes profissionais envolvidas no controle de qualidade do ar interior, no planejamento, elaboração, análise e execução de projetos físicos e nas ações de inspeção de ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo.

Reuniu-se na cidade de Brasília/DF, durante o ano de 2002, tendo como metas:

1. Promover processo de revisão na Resolução ANVISA -RE 176/00
2. Atualiza -la frente à realidade do conhecimento no país.
3. Disponibilizar informações sobre o conhecimento e a experiência adquirida nos dois primeiros anos de vigência da RE 176.

## II – ABRANGÊNCIA

O Grupo Técnico Assessor elaborou a seguinte Orientação Técnica sobre Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo, no que diz respeito à definição de valores máximos recomendáveis para contaminação biológica, química e parâmetros físicos do ar interior, a identificação das fontes poluentes de natureza biológica, química e física, métodos analíticos ( Normas Técnicas 001, 002, 003 e 004 ) e as recomendações para controle (Quadros I e II ).

Recomendou que os padrões referenciais adotadas por esta Orientação Técnica sejam aplicados aos ambientes climatizados de uso público e coletivo já existentes e aqueles a serem instalados. Para os ambientes climatizados de uso restrito, com exigências de filtros absolutos ou instalações especiais, tais como os que atendem a processos produtivos, instalações hospitalares e outros, sejam aplicados as normas e regulamentos específicos.

## III – DEFINIÇÕES

Para fins desta Orientação Técnica são adotadas as seguintes definições, complementares às adotadas na Portaria GM/MS n.º 3.523/98:

**a) Aerodispersóides:** sistema dispersa, em um meio gasoso, composto de partículas sólidas e/ou líquidas. O mesmo que aerosol ou aerossol.

**b) ambiente aceitável:** ambientes livres de contaminantes em concentrações potencialmente perigosas à saúde dos ocupantes ou que apresentem um mínimo de 80% dos ocupantes destes ambientes sem queixas ou sintomatologia de desconforto,<sup>2</sup>

**c) ambientes climatizados:** são os espaços fisicamente determinados e caracterizados por dimensões e instalações próprias, submetidos ao processo de climatização, através de equipamentos.

**d) ambiente de uso público e coletivo:** espaço fisicamente determinado e aberto a utilização de muitas pessoas.

**e) ar condicionado:** é o processo de tratamento do ar, destinado a manter os requerimentos de Qualidade do Ar Interior do espaço condicionado, controlando variáveis como a temperatura, umidade, velocidade, material particulado, partículas biológicas e teor de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

**f) Padrão Referencial de Qualidade do Ar Interior:** marcador qualitativo e quantitativo de qualidade do ar ambiental interior, utilizado como sentinela para determinar a necessidade da busca das fontes poluentes ou das intervenções ambientais.

**g) Qualidade do Ar Ambiental Interior:** Condição do ar ambiental de interior, resultante do processo de ocupação de um ambiente fechado com ou sem climatização artificial.

**h) Valor Máximo Recomendável:** Valor limite recomendável que separa as condições de ausência e de presença do risco de agressão à saúde humana.

#### IV – PADRÕES REFERENCIAIS

Recomenda os seguintes Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior em ambientes climatizados de uso público e coletivo.

1 - O Valor Máximo Recomendável - VMR, para contaminação microbiológica deve ser  $\leq 750$  ufc/m<sup>3</sup> de fungos, para a relação I/E  $\leq 1,5$ , onde I é a quantidade de fungos no ambiente interior e E é a quantidade de fungos no ambiente exterior.

NOTA: A relação I/E é exigida como forma de avaliação frente ao conceito de normalidade, representado pelo meio ambiente exterior e a tendência epidemiológica de amplificação dos poluentes nos ambientes fechados.

1.1 - Quando o VMR for ultrapassado ou a relação I/E for  $> 1,5$ , é necessário fazer um diagnóstico de fontes poluentes para uma intervenção corretiva.

1.2 - É inaceitável a presença de fungos patogênicos e toxigênicos.

2 – Os Valores Máximos Recomendáveis para contaminação química são:

2.1 - £ 1000 ppm de dióxido de carbono – ( CO<sub>2</sub> ) , como indicador de renovação de ar externo, recomendado para conforto e bem-estar<sup>2</sup>.

2.2 - £ 80 mg/m<sup>3</sup> de aerodispersóides totais no ar, como indicador do grau de pureza do ar e limpeza do ambiente climatizado<sup>4</sup>.

NOTA: Pela falta de dados epidemiológicos brasileiros é mantida a recomendação como indicador de renovação do ar o valor = 1000 ppm de Dióxido de carbono – CO<sub>2</sub>

3 – Os valores recomendáveis para os parâmetros físicos de temperatura, umidade, velocidade e taxa de renovação do ar e de grau de pureza do ar, deverão estar de acordo com a NBR 6401 – Instalações Centrais de Ar Condicionado para Conforto – Parâmetros Básicos de Projeto da ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas<sup>5</sup>.

3.1 - a faixa recomendável de operação das Temperaturas de Bulbo Seco, nas condições internas para verão, deverá variar de 23°C a 26°C, com exceção de ambientes de arte que deverão operar entre 21°C e 23°C. A faixa máxima de operação deverá variar de 26,5°C a 27°C, com exceção das áreas de acesso que poderão operar até 28°C. A seleção da faixa depende da finalidade e do local da instalação. Para condições internas para inverno, a faixa recomendável de operação deverá variar de 20°C a 22°C.

3.2 - a faixa recomendável de operação da Umidade Relativa, nas condições internas para verão, deverá variar de 40% a 65%, com exceção de ambientes de arte que deverão operar entre 40% e 55% durante todo o ano. O valor máximo de operação deverá ser de 65%, com exceção das áreas de acesso que poderão operar até 70%. A seleção da faixa depende da finalidade e do local da instalação. Para condições internas para inverno, a faixa recomendável de operação deverá variar de 35% a 65%.

3.3 – o Valor Máximo Recomendável - VMR de operação da Velocidade do Ar, no nível de 1,5m do piso, na região de influência da distribuição do ar é de menos 0,25 m/s.

3.4 - a Taxa de Renovação do Ar adequada de ambientes climatizados será, no mínimo, de 27 m<sup>3</sup>/hora/pessoa, exceto no caso específico de ambientes com alta rotatividade de pessoas. Nestes casos a Taxa de Renovação do Ar mínima será de 17 m<sup>3</sup> /hora/pessoa, não sendo admitido em qualquer situação que os ambientes possuam uma concentração de CO<sub>2</sub>, maior ou igual a estabelecida em IV-2.1, desta Orientação Técnica.

3.5 - a utilização de filtros de classe G1 é obrigatória na captação de ar exterior. O Grau de Pureza do Ar nos ambientes climatizados será obtido utilizando-se, no mínimo, filtros de classe G-3 nos condicionadores de sistemas



centrais, minimizando o acúmulo de sujidade nos dutos, assim como reduzindo os níveis de material particulado no ar insuflado<sup>2</sup>.

Os padrões referenciais adotados complementam as medidas básicas definidas na Portaria GM/MS n.º 3.523/98, de 28 de agosto de 1998, para efeito de reconhecimento, avaliação e controle da Qualidade do Ar Interior nos ambientes climatizados. Deste modo poderão subsidiar as decisões do responsável técnico pelo gerenciamento do sistema de climatização, quanto a definição de periodicidade dos procedimentos de limpeza e manutenção dos componentes do sistema, desde que asseguradas as frequências mínimas para os seguintes componentes, considerados como reservatórios, amplificadores e disseminadores de poluentes.

<b>Componente</b>	<b>Periodicidade</b>
Tomada de ar externo	Limpeza mensal ou quando descartável até sua obliteração (máximo 3 meses)
Unidades filtrantes	Limpeza mensal ou quando descartável até sua obliteração (máximo 3 meses)
Bandeja de condensado	Mensal*
Serpentina de aquecimento	Desencrustação semestral e limpeza trimestral
Serpentina de resfriamento	Desencrustação semestral e limpeza trimestral
Umidificador	Desencrustação semestral e limpeza trimestral
Ventilador	Semestral
Plenum de mistura/casa de máquinas	Mensal

\*- Excetuando na vigência de tratamento químico contínuo que passa a respeitar a periodicidade indicada pelo fabricante do produto utilizado.

## V – FONTES POLUENTES

Recomenda que sejam adotadas para fins de pesquisa e com o propósito de levantar dados sobre a realidade brasileira, assim como para avaliação e correção das situações encontradas, as possíveis fontes de poluentes informadas nos Quadros I e II.

### QUADRO I

#### Possíveis fontes de poluentes biológicos 6

<b>Agentes biológicos</b>	<b>Principais fontes em ambientes interiores</b>	<b>Principais Medidas de correção em ambientes interiores</b>
Bactérias	Reservatórios com água Estagnada, torres de resfriamento, bandejas de Condensado, desumificadores, umidificadores, serpentinas de condicionadores de ar e superfícies úmidas e quentes.	Realizar a limpeza e a conservação das torres de resfriamento; higienizar os reservatórios e bandejas de Condensado ou manter tratamento contínuo para

		eliminar as fontes; eliminar as infiltrações; higienizar as superfícies.
Fungos	Fungos Ambientos úmidos e demais fontes de multiplicação fúngica, como materiais porosos orgânicos úmidos, forros, paredes e isolamentos úmidos; ar externo, interior de condicionadores e dutos sem manutenção, vasos de terra com plantas.	Corrigir a umidade ambiental; manter sob controle rígido vazamentos, infiltrações e condensação de água; higienizar os ambientes e componentes do sistema de climatização ou manter tratamento contínuo para eliminar as fontes; eliminar materiais porosos contaminados; eliminar ou restringir vasos de plantas com cultivo em terra, ou substituir pelo cultivo em água (hidroponia); utilizar filtros G-1 na renovação do ar externo.
Protozoários	Reservatórios de água contaminada, bandejas e umidificadores de condicionadores sem manutenção.	Higienizar o reservatório ou manter tratamento contínuo para eliminar as fontes.
Vírus	Hospedeiro humano.	Adequar o número de ocupantes por m <sup>2</sup> de área com aumento da renovação de ar; evitar a presença de pessoas infectadas nos ambientes climatizados.
Algas	Torres de resfriamento e bandejas de condensado.	Higienizar os reservatórios e bandejas de condensado ou manter tratamento contínuo para eliminar as fontes.
Pólen	Ar externo.	Manter filtragem de acordo com NBR-6401 da ABNT.
Artrópodes	Poeira caseira.	Higienizar as superfícies fixas e mobiliário, especialmente os revestidos com tecidos e tapetes; restringir ou eliminar o uso desses revestimentos.
Animais	Roedores, morcegos e aves.	Restringir o acesso, controlar os roedores, os morcegos, ninhos de aves e respectivos excrementos.

### Possíveis fontes de poluentes químicos 7

Agentes químicos	Principais fontes em ambientes interiores	Principais medidas de correção em ambientes interiores
CO	Combustão (cigarros, queimadores de fogões e veículos automotores).	Manter a captação de ar exterior com baixa concentração de poluentes; restringir as fontes de combustão; manter a exaustão em áreas em que ocorre combustão; eliminar a infiltração de CO proveniente de fontes externas; restringir o tabagismo em áreas fechadas.
CO2	Produtos de metabolismo humano e combustão.	Aumentar a renovação de ar externo; restringir as fontes de combustão e o tabagismo em áreas fechadas; eliminar infiltração de fontes externas.
NO2	Combustão	Restringir as fontes de combustão; manter a exaustão em áreas em que ocorre combustão; impedir a infiltração de NO2 proveniente de fontes externas; restringir o tabagismo em áreas fechadas.
O3	Máquinas copiadoras e impressoras a laser.	Adotar medidas específicas para reduzir a contaminação dos ambientes interiores, com exaustão do ambiente ou enclausuramento em locais exclusivos para os equipamentos que apresentem grande capacidade de produção de O3.
Formaldeído	Materiais de acabamento, mobiliário, cola, produtos de limpeza domissanitários	Selecionar os materiais de construção, acabamento e mobiliário que possuam ou emitam menos formaldeído; usar produtos domissanitários que não contenham formaldeído.
Material particulado	Poeira e fibras.	Manter filtragem de acordo com NBR-6402 da ABNT; evitar isolamento termo-acústico que possa emitir fibras minerais, orgânicas e sintéticas para o ambiente climatizado; reduzir fontes internas e Ex-ternas; higienizar as superfícies fixas e mobiliários sem uso de vassouras, escovas ou espanadores; selecionar os materiais de construção e acabamento com menor porosidade; adotar medidas específicas para reduzir a

		contaminação dos ambientes interiores (vide biológicos);restringir o tabagismo em áreas fechadas.
Fumo de tabaco	Queima de cigarro, charuto, cachimbo, etc.	Aumentar a quantidade de ar externo admitido para renovação e/ou exaustão dos poluentes; restringir o tabagismo em áreas fechadas.
COV	Cera, mobiliário, produtos usados em limpeza e domissanitários, solventes, materiais de revestimento, tintas, colas, etc.	Selecionar os materiais de construção, acabamento, mobiliário; usar produtos de limpeza e domissanitários que não contenham COV ou que não apresentem alta taxa de volatilização e toxicidade.

COS-V	Queima de combustíveis e utilização de pesticidas.	Eliminar a contaminação por fontes pesticidas, inseticidas e a queima de combustíveis; manter a captação de ar exterior afastada de poluentes.
-------	--	--

COV – Compostos Orgânicos Voláteis.

COS-V – Compostos Orgânicos Semi- Voláteis.

**Observações** - Os poluentes indicados são aqueles de maior ocorrência nos ambientes de interior, de efeitos conhecidos na saúde humana e de mais fácil detecção pela estrutura laboratorial existente no país.

Outros poluentes que venham a ser considerados importantes serão incorporados aos indicados, desde que atendam ao disposto no parágrafo anterior.

## VI – AVALIAÇÃO E CONTROLE

Recomenda que sejam adotadas para fins de avaliação e controle do ar ambiental interior dos ambientes climatizados de uso coletivo, as seguintes Normas Técnicas 001, 002, 003 e 004.

Na elaboração de relatórios técnicos sobre qualidade do ar interior, é recomendada a NBR-10.719 da ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas.

**1** World Health Organization. Indoor air quality: biological contaminants; Copenhagen , Denmark , 1983 ( European Series nº 31).

**2** American Society of Heating, Refrigerating and Air Conditioning Engineers, Inc. ASHRAE Standard 62 - Ventilation for Acceptable Indoor Air Quality, 2001

3 Kulcsar Neto, F & Siqueira, LFG. Padrões Referenciais para Análise de Resultados de Qualidade Microbiológica do Ar em Interiores Visando a Saúde Pública no Brasil – *Revista da Brasindoor* . 2 (10): 4-21,1999.

4 Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA , **Resolução n.º 03** de 28/06 / 1990.

5 ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas, **NBR 6401 – Instalações Centrais de Ar Condicionado para Conforto – Parâmetros Básicos de Projeto**, 1980.

6 Siqueira, LFG & Dantas, EHM. **Organização e Métodos no Processo de Avaliação da Qualidade do Ar de Interiores** - *Revista da Brasindoor* , 3 (1): 19-26, 1999.

7 Aquino Neto, F.R; Brickus, L.S.R. Padrões Referenciais para Análise de Resultados da Qualidade Físico-química do Ar de Interior Visando a Saúde Pública . *Revista da Brasindoor* , 3(2):4 -15,1999

#### NORMA TÉCNICA 001

Qualidade do Ar Ambiental Interior. Método de Amostragem e Análise de Bioaerosol em Ambientes Interiores.

#### MÉTODO ANALÍTICO

OBJETIVO: Pesquisa, monitoramento e controle ambiental da possível colonização, multiplicação e disseminação de fungos em ar ambiental interior.

#### DEFINIÇÕES:

*Bioaerosol*: Suspensão de microorganismos (organismos viáveis) dispersos no ar.

*Marcador epidemiológico* : Elemento aplicável à pesquisa, que determina a qualidade do ar ambiental.

APLICABILIDADE: Ambientes de interior climatizados, de uso coletivo, destinados a ocupações comuns (não especiais).

MARCADOR EPIDEMIOLÓGICO: Fungos viáveis.

MÉTODO DE AMOSTRAGEM: Amostrador de ar por impactação com acelerador linear.

PERIODICIDADE: Semestral.

#### FICHA TÉCNICA DO AMOSTRADOR:

**Amostrador**: Impactador de 1, 2 ou 6 estágios.

**Meio de Cultivo:** Agar Extrato de Malte, Agar Sabouraud Dextrose a 4%, Agar Batata Dextrose ou outro, desde que cientificamente validado.

**Taxa de Vazão:** fixa entre 25 a 35 l/min, sendo recomendada 28,3 l/min.

**Tempo de Amostragem:** de 5 a 15 minutos, dependendo das especificações do amostrador.

**Volume Mínimo:** 140 l

**Volume Máximo:** 500 l

**Embalagem:** Rotina de embalagem para proteção da amostra com nível de biossegurança 2 (recipiente lacrado, devidamente identificado com símbolo de risco biológico)

**Transporte:** Rotina de embalagem para proteção da amostra com nível de biossegurança 2 (recipiente lacrado, devidamente identificado com símbolo de risco biológico)

Nota: Em áreas altamente contaminadas, pode ser recomendável uma amostragem com tempo e volume menores.

<b>Calibração:</b> Semestral	<b>Exatidão:</b> 0,02 l/min.
	<b>Precisão:</b> 99,92 %

#### ESTRATÉGIA DE AMOSTRAGEM:

selecionar 01 amostra de ar exterior localizada fora da estrutura predial na altura de 1,50 m do nível da rua.

Definir o número de amostras de ar interior, tomando por base a área construída climatizada dentro de uma mesma edificação e razão social, seguindo a tabela abaixo:

Área construída (m <sup>2</sup> )	Número mínimo de amostras
Até 1.000	1
1.000 a 2.000	3
2.000 a 3.000	5
3.000 a 5.000	8
5.000 a 10.000	12
10.000 a 15.000	15
15.000 a 20.000	18
20.000 a 30.000	21
Acima de 30.000	25

As unidades funcionais dos estabelecimentos com características epidemiológicas diferenciadas, tais como serviço médico, restaurantes, creches

e outros, deverão ser amostrados isoladamente. Os pontos amostrais deverão ser distribuídos uniformemente e coletados com o amostrador localizado na altura de 1,5 m do piso, no centro do ambiente ou em zona ocupada.

**PROCEDIMENTO LABORATORIAL:** Método de cultivo e quantificação segundo normatizações universalizadas. Tempo mínimo de incubação de 7 dias a 25°C., permitindo o total crescimento dos fungos.

**BIBLIOGRAFIA:** "Standard Methods for Examination of Water and Wastewater". 17<sup>th</sup> ed. APHA, AWWA, WPC.F; "The United States Pharmacopeia". USP, XXIII ed., NF XVIII, 1985.

NIOSH- National Institute for Occupational Safety and Health, NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM),

BIOAEROSOL SAMPLING (Indoor Air) 0800, Fourth Edition.

IRSST – Institute de Recherche en Santé et en Sécurité du Travail du Quebec, Canada, 1994.

Members of the Technical Advisory Committee on Indoor Air Quality, Commission of Public Health Ministry of the

Environment – Guidelines for Good Indoor Air Quality in Office Premises, Singapore.

NORMA TÉCNICA 002

Qualidade do Ar Ambiental Interior. Método de Amostragem e Análise da Concentração de Dióxido de Carbono em Ambientes Interiores.

#### MÉTODO ANALÍTICO

**OBJETIVO:** Pesquisa, monitoramento e controle do processo de renovação de ar em ambientes climatizados.

**APLICABILIDADE:** Ambientes interiores climatizados, de uso coletivo.

**MARCADOR EPIDEMIOLÓGICO:** Dióxido de carbono ( CO<sub>2</sub> ).

**MÉTODO DE AMOSTRAGEM:** Equipamento de leitura direta.

**PERIODICIDADE:** Semestral.

#### FICHA TÉCNICA DOS AMOSTRADORES:

<b>Amostrador:</b> Leitura Direta por meio de sensor infravermelho não dispersivo ou célula eletroquímica.	
<b>Calibração:</b> Anual ou de acordo com especificação do fabricante.	<b>Faixa:</b> de 0 a 5.000 ppm.
	<b>Exatidão:</b> 50 ppm + 2% do valor

	medido
--	--------

#### ESTRATÉGIA DE AMOSTRAGEM:

Definir o número de amostras de ar interior, tomando por base a área construída climatizada dentro de uma mesma edificação e razão social, seguindo a tabela abaixo:

Área construída (m <sup>2</sup> )	Número mínimo de amostras
Até 1.000	1
1.000 a 2.000	3
2.000 a 3.000	5
3.000 a 5.000	8
5.000 a 10.000	12
10.000 a 15.000	15
15.000 a 20.000	18
20.000 a 30.000	21
Acima de 30.000	25

Das unidades funcionais dos estabelecimentos com características epidemiológicas diferenciadas, tais como serviço médico, restaurantes, creches e outros, deverão ser amostrados isoladamente.

Dos pontos amostrais deverão ser distribuídos uniformemente e coletados com o amostrador localizado na altura de 1,5 m do piso, no centro do ambiente ou em zona ocupada.

PROCEDIMENTO DE AMOSTRAGEM: As medidas deverão ser realizadas em horários de pico de utilização do ambiente.

#### NORMA TÉCNICA 003

Qualidade do Ar Ambiental Interior. Método de Amostragem. Determinação da Temperatura, Umidade e Velocidade do Ar em Ambientes Interiores.

#### MÉTODO ANALÍTICO

OBJETIVO: Pesquisa, monitoramento e controle do processo de climatização de ar em ambientes climatizados.

APLICABILIDADE: Ambientes interiores climatizados, de uso coletivo.

MARCADORES: Temperatura do ar ( °C )

Umidade do ar ( % )

Velocidade do ar ( m/s ) .



MÉTODO DE AMOSTRAGEM: Equipamentos de leitura direta. Termo-higrômetro e Anemômetro.

PERIODICIDADE: Semestral.

FICHA TÉCNICA DOS AMOSTRADORES:

Amostrador: Leitura Direta – Termo-higrômetro.	
Princípio de operação: Sensor de temperatura do tipo termo-resistência.	
Sensor de umidade do tipo capacitivo ou por condutividade elétrica.	
Calibração: Anual	Faixa: 0° C a 70° C de temperatura e 5% a 95 % de umidade
	Exatidão: $\pm 0,8$ ° C de temperatura $\pm 5\%$ do valor medido de umidade

Amostrador: Leitura Direta – Anemômetro.	
Princípio de operação: Preferencialmente de sensor de velocidade do ar do tipo fio aquecido ou fio térmico.	
Calibração: Anual	Faixa: de 0 a 10 m/s
	Exatidão: $\pm 0,1$ m/s $\pm 4\%$ do valor medido

ESTRATÉGIA DE AMOSTRAGEM:

Definir o número de amostras de ar interior, tomando por base a área construída climatizada dentro de uma mesma edificação e razão social, seguindo a tabela abaixo:

Área construída (m <sup>2</sup> )	Número mínimo de amostras
Até 1.000	1
1.000 a 2.000	3
2.000 a 3.000	5
3.000 a 5.000	8
5.000 a 10.000	12
10.000 a 15.000	15
15.000 a 20.000	18
20.000 a 30.000	21
Acima de 30.000	25

Das unidades funcionais dos estabelecimentos com características epidemiológicas diferenciadas, tais como serviço médico, restaurantes, creches e outros, deverão ser amostrados isoladamente.

Dos pontos amostrais deverão ser distribuídos uniformemente e coletados com o amostrador localizado na altura de 1,5 m do piso, no centro do ambiente ou em zona ocupada, para o Termo-higrômetro e no espectro de ação do difusor para o Anemômetro.

#### **Norma Técnica 004**

Qualidade do Ar Ambiental Interior. Método de Amostragem e Análise de Concentração de Aerodispersóides em Ambientes Interiores.

#### MÉTODO ANALÍTICO

**OBJETIVO:** Pesquisa, monitoramento e controle de aerodispersóides totais em ambientes interiores climatizados.

**APLICABILIDADE:** Ambientes de interior climatizados, de uso coletivo, destinados a ocupações comuns (não especiais).

**MARCADOR EPIDEMIOLÓGICO:** Poeira Total (mg/m<sup>3</sup> ).

**MÉTODO DE AMOSTRAGEM:** Coleta de aerodispersóides por filtração (MB - 3422 da ABNT).

**PERIODICIDADE:** Semestral.

#### FICHA TÉCNICA DO AMOSTRADOR:

Amostrador: Unidade de captação constituída por filtros de PVC, diâmetro de 37 mm e porosidade de 5 mm de diâmetro de poro específico para poeira total a ser coletada; Suporte de filtro em disco de celulose; Portafiltro em plástico transparente com diâmetro de 37 mm. Aparelhagem: Bomba de amostragem, que mantenha ao longo do período de coleta, a vazão inicial de calibração com variação de 5%.

Taxa de Vazão: 1,0 a 3,0 l/min, recomendado 2,0 l/min.

Volume Mínimo: 50 l / Volume Máximo: 400 l

Tempo de Amostragem: relação entre o volume captado e a taxa de vazão utilizada

Embalagem: Rotina

Calibração: Em cada procedimento de coleta se operado com bombas diafragmáticas	Exatidão: ± 5% do valor medido
---	--------------------------------

#### ESTRATÉGIA DE AMOSTRAGEM:

Definir o número de amostras de ar interior, tomando por base a área construída climatizada dentro de uma mesma edificação e razão social, seguindo a tabela abaixo:

<b>Área construída (m<sup>2</sup>)</b>	<b>Número mínimo de amostras</b>
Até 1.000	1
1.000 a 2.000	3
2.000 a 3.000	5
3.000 a 5.000	8
5.000 a 10.000	12
10.000 a 15.000	15
15.000 a 20.000	18
20.000 a 30.000	21
Acima de 30.000	25

Das unidades funcionais dos estabelecimentos com características epidemiológicas diferenciadas, tais como serviço médico, restaurantes, creches e outros, deverão ser amostrados isoladamente.

Dos pontos amostrais deverão ser distribuídos uniformemente e coletados com o amostrador localizado na altura de 1,5 m do piso, no centro do ambiente ou em zona ocupada.

PROCEDIMENTO DE COLETA: MB-3422 da ABNT.

PROCEDIMENTO DE CALIBRAÇÃO DAS BOMBAS: NBR- 10.562 da ABNT

PROCEDIMENTO LABORATORIAL: NHO 17 da FUNDACENTRO

## VII – INSPEÇÃO

Recomenda que os órgãos competentes de Vigilância Sanitária com o apoio de outros órgãos governamentais, organismos representativos da comunidade e dos ocupantes dos ambientes climatizados, utilizem esta Orientação Técnica como instrumento técnico referencial, na realização de inspeções e de outras ações pertinentes nos ambientes climatizados de uso público e coletivo.

## VIII – RESPONSABILIDADE TÉCNICA

Recomenda que os proprietários, locatários e prepostos de estabelecimentos com ambientes ou conjunto de ambientes dotados de sistemas de climatização com capacidade igual ou superior a 5 TR (15.000 kcal/h = 60.000 BTU/h), devam manter um responsável técnico atendendo ao determinado na Portaria GM/MS nº 3.523/98, além de desenvolver as seguintes atribuições:

a) providenciar a avaliação biológica, química e física das condições do ar interior dos ambientes climatizados;

- b) promover a correção das condições encontradas, quando necessária, para que estas atendam ao estabelecido no Art. 4º desta Resolução;
- c) manter disponível o registro das avaliações e correções realizadas;
- d) divulgar aos ocupantes dos ambientes climatizados os procedimentos e resultados das atividades de avaliação, correção e manutenção realizadas.

Em relação aos procedimentos de amostragem, medições e análises laboratoriais, considera-se como responsável técnico, o profissional que tem competência legal para exercer as atividades descritas, sendo profissional de nível superior com habilitação na área de química (Engenheiro químico, Químico e Farmacêutico) e na área de biologia (Biólogo, Farmacêutico e Biomédico) em conformidade com a regulamentação profissional vigente no país e comprovação de Responsabilidade Técnica - RT, expedida pelo Órgão de Classe.

As análises laboratoriais e sua responsabilidade técnica devem obrigatoriamente estar desvinculadas das atividades de limpeza, manutenção e comercialização de produtos destinados ao sistema de climatização.

## 11 APÊNDICES

### 11.1 Artigo a ser submetido a Revista de Saúde Pública

#### MICROBIOTA FÚNGICA DO AR E DOS FILTROS DE CONDICIONADORES DE AR EM AMBIENTE CLIMATIZADO DE UM HOSPITAL PÚBLICO DE MACEIÓ-AL

MICROBIOTA FÚNGICA DO AR E DOS FILTROS DE CONDICIONADORES DE AR EM AMBIENTE CLIMATIZADO DE UM HOSPITAL PÚBLICO DE MACEIÓ-AL

#### RESUMO

Os fungos são seres oportunistas, com ampla distribuição pela natureza, incluindo o ambiente hospitalar, onde é freqüente a presença de microrganismos causadores de infecção hospitalar, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Visando identificar e quantificar a microbiota fúngica do ar, dos filtros dos condicionadores de ar e de amostras dos recém-nascidos da UTI neonatal do Hospital Universitário/HUPAA, Maceió, Alagoas. Foram realizadas 20 coletas totalizando 400 exposições de placas de Petri descartáveis contendo o meio agar Sabouraud acrescido de antibiótico. As placas foram posicionadas aleatoriamente e abertas no interior das duas UTIs neonatais (A e B) durante 20 minutos. Também, foram realizadas 20 coletas dos filtros dos condicionadores de ar das UTIs neonatais e realizado o exame direto e cultura das amostras clínicas provenientes dos recém-nascidos. Foram isoladas 1209 UFC, destas 675 (55,8%) UFC foram isoladas antes de ser realizada a limpeza da UTI neonatal e 534 (44,2%) UFC obtidas depois da limpeza. Das 697 UFC do ambiente A da UTI neonatal, 372 foram isoladas antes e 325 depois da limpeza. Do ambiente B, foram obtidas 512 UFC e dessas 303 UFC foram obtidas antes da limpeza e 209 UFC depois. Durante o estudo espécies de *Cladosporium* foi o mais representativo no ar do ambiente, assim como nos filtros dos condicionadores de ar. A presença de fungos patogênicos nos dois ambientes da UTI neonatal demonstrando a necessidade de um monitoramento constante para se ter o controle desses microrganismos em ambientes hospitalares, principalmente em unidades de terapia intensiva onde há a presença de pacientes imunocomprometidos propícios a desenvolver infecções fúngicas.

#### ABSTRACT

The fungi are being opportunistic, with wide distribution in nature, including the hospital environment, where it is frequent the presence of microorganisms that cause hospital infection, especially in immunocompromised patients. To identify and quantify the fungal microbiota in air, the filters of air-conditioners and samples of newborns from the neonatal ICU at University Hospital / HUPA, Maceió, Alagoas. Were held 20 exhibitions of collections totaling 400 disposable Petri dishes containing Sabouraud agar medium plus antibiotic. The plates were placed randomly inside and open the two neonatal ICUs (A and B) for 20 minutes. Also, there were 20 samples of the filters of air-conditioners of neonatal ICUs and conducted the direct examination and culture of clinical samples from newborns. CFU were isolated in 1209, these 675 (55.8%) were

isolated CFU before cleaning to be done in the neonatal ICU and 534 (44.2%) CFU obtained after cleaning. Of 697 CFU of the environment of the NICU, 372 were isolated before and 325 after cleaning. Environment B, were obtained of 512 CFU and 303 CFU were obtained before cleaning and 209 after UFC. During the study species of *Cladosporium* was the most representative in the air and in the filters of air-conditioners. The presence of pathogenic fungi in the two environments of NICU demonstrating the need for constant monitoring to take control of microorganisms in hospital environments, especially in intensive care units where there is the presence of immunocompromised patients prone to develop fungal infections.

## INTRODUÇÃO

Os fungos dispersos através do ar atmosférico são denominados de fungos anemófilos e por serem oportunistas provocam patologias no ser humano (JAWETS, 1998). Esses fungos são comumente encontrados como componentes da microbiota transitória do homem e de animais domésticos (TRABULSI *et al*, 2000).

Fungos oportunistas como os dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Candida* e *Fusarium* são responsáveis por doenças desde otites, micotoxicoses, infecções urinárias, onicomicoses, infecções oculares até fungemias. Fato este bastante preocupante a clínica médica, pois tais microrganismos estão dispersos abundantemente no meio ambiente (SIDRIN e ROCHA, 2004; GRUMACH, 2001).

No ambiente hospitalar é frequente a presença de microrganismos no ar, no piso, paredes, equipamentos cirúrgicos, móveis hospitalares, e funcionários. E estes, podem infectar preferencialmente os pacientes imunocomprometidos que fazem uso de catéteres, diálise, recém-nascidos, idosos, causando infecções intra-hospitalares severas (RICHARDSON e WARNOCK, 1993).

No Brasil, de acordo com a Portaria nº 2.616/98, do Ministério da Saúde, as infecções nos neonatos são sempre consideradas hospitalares, com exceção das transmitidas via placentária e aquelas associadas à rotura prematura de membrana por período superior a 24h (CALIL, 2001).

As infecções hospitalares constituem um importante fator para o aumento da mortalidade neonatal. Dados da literatura evidenciam que a mortalidade nesta faixa etária situa-se entre 15,5 e 64,4%, quando relacionado relacionada à IH. (MEDINA *et al.*, 2000; NAGATA *et al.*, 2002; GARBERS *et al*, 2004; MALVEIRA *et al.*, 2004; DUARTE E MENDONÇA, 2005).

Investigações da ocorrência de fungos ambientais, em especial os que compõem a microbiota anemófila hospitalares, habitualmente oportunistas são importantes para prevenção de doenças alérgicas, bem como de infecções hospitalares provocadas por estes potenciais patógenos ao homem (GRUMACH, 2001).

Os primeiros relatos sobre a importância do meio ambiente hospitalar como fonte de transmissão de agentes infecciosos foram associados à contaminação do ar com esporos de *Aspergillus* sp. (PANNUTI, 1997). A exposição ao ar contaminado por fungos e seus metabólitos em ambientes internos climatizados têm preocupado autoridades em todo mundo (SIQUEIRA *et al*, 2003).

Por isso, atualmente a legislação brasileira através da Resolução - RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003 sobre o Padrão Referencial de Qualidade de ar

Interior, em ambientes climatizados de uso público e coletivo, elaborado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), refere-se a avaliação da qualidade do ar, estabelecendo limites aceitáveis de contaminação microbiológicas para fungos (BRASIL, 2003).

Devido ao potencial patogênico apresentado por muitos fungos tidos como oportunistas, principalmente em ambientes hospitalar e ao aumento progressivo das infecções fúngicas em pacientes imunocomprometidos, foi realizado este estudo com o objetivo de conhecer a microbiota fúngica existente no ar e nos filtros dos condicionadores de ar antes e depois de realizar a limpeza da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTIN) do Hospital Universitário Prof. Dr. Alberto Antunes-HUPAA.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Local de coleta** - foram coletadas amostras do ar dos dois ambientes (A e B) da UTI neonatal do Hospital Universitário Prof. Dr. Alberto Antunes, localizado no município de Maceió, Alagoas, durante o período de Abril de 2007 a Março de 2008.

**Técnica de coleta** - a coleta dos fungos do ar foi realizada através da técnica de exposição de placas de Petri – Técnica de sedimentação passiva (KERN e BLEVINS, 1999; LACAZ *et al.*, 2002) contendo o meio Agar Sabouraud acrescido de 50 µg /L cloranfenicol para deposição de esporos ou outras estruturas fúngicas presentes no ar atmosférico. As placas de Petri descartáveis foram abertas nos dois ambientes determinados durante 20 minutos a uma altura de um metro do chão, distante das paredes (OLIVEIRA *et al.*, 1993). As placas foram expostas antes e depois da limpeza do ambiente, perfazendo-se um total de 20 placas por coleta nos dois ambientes.

O processo de análise da contaminação dos filtros dos condicionadores de ar foi realizado através de coleta com um Swab esterilizado embebido em água esterilizada adicionada de 50 µg /L cloranfenicol. Posteriormente, o Swab foi semeado por espalhamento radial em uma placa de Petri descartável contendo o meio Sabouraud.

**Identificação dos fungos** - a identificação dos fungos anemófilos foi baseada nos aspectos macroscópicos das colônias e microscópicos pelo exame direto da cultura. Aqueles que não puderam ser identificados pela ausência de estruturas reprodutivas, foram cultivados em meios especiais a fim de estimular a esporulação, utilizando-se a técnica de microcultivo em lâmina (RIDEL, 1950).

**Avaliação estatística** - a análise estatística foi realizada com o *software* Biostat 5.0<sup>®</sup> utilizando-se os testes Anova-Manova pareada, teste-t e teste-z aplicado para avaliar as variáveis encontradas antes e após a realização da higienização da UTI neonatal. As médias foram consideradas estatisticamente significativa quando  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

A análise quantitativa da contagem das colônias permitiu observar a presença de 1209 unidades formadoras de colônias (UFC), destas, 675 (55,8%) UFC foram isoladas antes de ser realizada a limpeza da UTI neonatal e 534 (44,2%) UFC obtidas depois da limpeza. O valor médio de colônias encontradas antes e após a limpeza foi  $8,23 \pm 11,19$  e  $7,39 \pm 10,34$  UFC, respectivamente. Comparando esses valores, não foi observada uma redução significativa da concentração de fungos depois da limpeza.

Foram isoladas 697 UFC no ambiente A da UTI neonatal, com valor médio de  $9,07 \pm 12,04$  UFC antes e  $7,93 \pm 12,95$  UFC depois da limpeza. Do ambiente B, foram obtidas 512 UFC com média de  $7,39 \pm 10,34$  UFC antes da limpeza e  $5,10 \pm 7,96$  depois (Figura 1).

Foi identificada a presença de fungos patogênicos, toxicogênicos e alergizante em ambos ambientes (A e B) da UTI neonatal. Durante a realização deste estudo foram identificados 23 gêneros de fungos anemófilos e 41 espécies de Eumycetes, segundo o sistema de classificação de Alexopoulos e Mims (1979), onde está representada a classe dos Deuteromycetes, subclasse Hyphomycetidae, incluindo duas famílias (Moniliaceae e Dematiaceae) (Tabela 1).

Dos 23 gêneros isolados, *Cladosporium* foi o mais representativo com 324 UFC representando 26,8% dos isolados, seguido pelos gêneros *Penicillium* com 300 UFC (24,8%), *Aspergillus* com 224 (18,4%) e entre outros gêneros com frequência inferior a 4,7% do total de colônias isoladas (Figura 2).

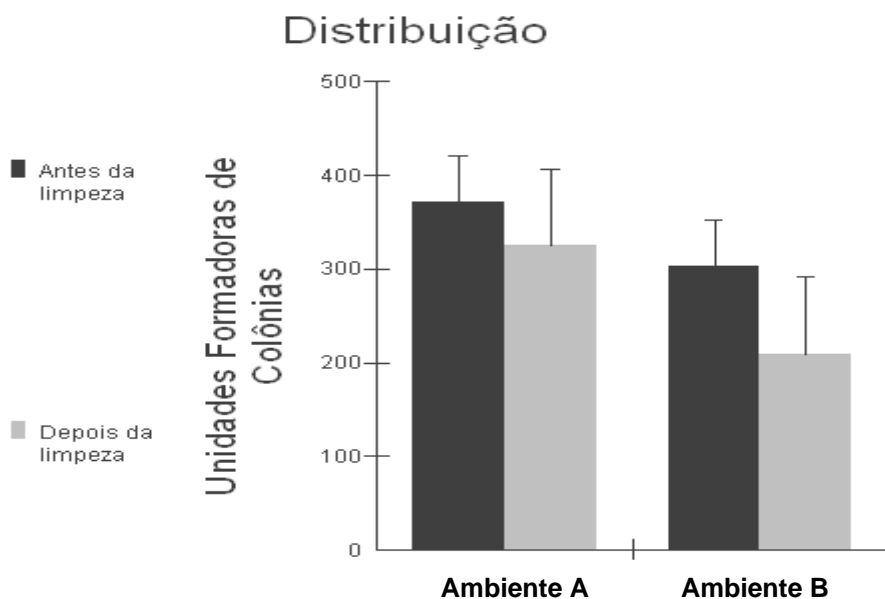
A avaliação de fungos anemófilos antes e após a limpeza dos ambientes A e B evidenciou a redução de UFC do gênero *Cladosporium*. Entretanto, a contagem de UFC dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* obtidas antes da limpeza foram inferiores aquelas verificadas depois, observando-se um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) desses gêneros. Fato este justificado pela alta esporulação produzida por esses fungos e o ato inadequado de higienização suspender esses esporos no ambiente (Figura 2).



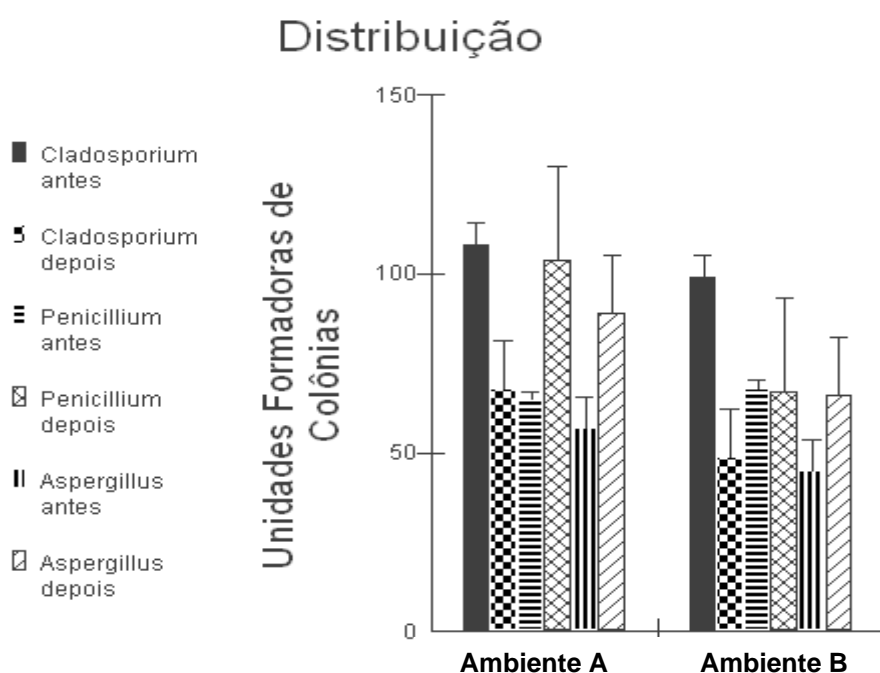
**Tabela 4:** Fungos anemófilos isolados dos dois ambientes (A e B), antes e após a limpeza da Unidade de Terapia Intensiva Neonatal (UTI) do Hospital Universitário Prof<sup>o</sup>. Dr. Alberto Antunes HUPAA/UFAL, Maceió, AL.

Espécies	UTI NEONATAL AMBIENTE A				UTI NEONATAL AMBIENTE B				TOTAL
	Antes		Após		Antes		Após		
	Limpeza		Limpeza		Limpeza		Limpeza		
	UFC	%	UFC	%	UFC	%	UFC	%	
<i>Cladosporium cladosporioides</i> <sup>NP</sup>	64	34,4	52	27,9	48	25,8	22	11,8	186
<i>C. sphaerospermum</i> <sup>P</sup>	24	25,5	11	11,7	36	38,3	23	24,4	94
<i>C. herbarum</i> <sup>P</sup>	18	56,2	5	15,6	9	28,1	-	-	32
<i>C. oxysporum</i> <sup>P</sup>	2	16,7	-	-	6	50	4	33,3	12
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> <sup>NP</sup>	38	28,8	56	42,4	17	12,9	21	15,9	132
<i>P. expansum</i> <sup>P</sup>	10	14,7	16	23,5	28	41,2	14	20,6	68
<i>P. chrysogenum</i> <sup>P</sup>	7	19,5	12	33,3	7	19,4	10	27,8	36
<i>P. verruculosum</i> <sup>NP</sup>	5	17,8	9	32,1	5	17,8	9	32,1	28
<i>P. purpurogenum</i> <sup>P; A</sup>	4	25	6	37,5	4	25	6	37,5	16
<i>P. citrinum</i> <sup>P</sup>	1	8,3	5	41,7	2	16,6	4	33,4	12
<i>P. decubens</i> <sup>P</sup>	-	-	-	-	5	62,5	3	37,5	8
<i>Aspergillus oryzae</i> <sup>P; A</sup>	26	23,0	38	33,6	16	14,2	33	29,2	113
<i>A. niger</i> <sup>P</sup>	11	18,3	19	31,6	12	20,1	18	30,0	60
<i>A. fumigatus</i> <sup>P; A</sup>	8	19,5	15	36,6	8	19,5	10	24,4	41
<i>A. nidulans</i> <sup>P</sup>	7	29,2	10	41,7	4	16,6	3	12,5	24
<i>A. ustus</i> <sup>P</sup>	5	26,3	7	36,8	5	26,4	2	10,5	19
<i>Alternaria alternata</i> <sup>P</sup>	8	80	2	20	-	-	-	-	10
<i>Acremonium kiliense</i> <sup>P</sup>	5	100,0	-	-	-	-	-	-	5
<i>Mycelia sterilia</i> <sup>NP</sup>	23	40,3	15	26,3	14	24,5	5	8,9	57
<i>Monilia sitophila</i> <sup>NP</sup>	16	30,2	12	22,6	17	32,1	8	15,1	53
<i>Aureobasidium pullulans</i> <sup>P</sup>	11	22,0	9	18,0	22	44,0	8	16,0	50
<i>Bipolaris hawaiiensis</i> <sup>P</sup>	2	66,7	1	33,3	-	-	-	-	3
<i>B. spicifera</i> <sup>P</sup>	2	100,0	-	-	-	-	-	-	2
<i>Curvularia clavata</i> <sup>P</sup>	5	41,7	3	25,0	4	33,3	-	-	12
<i>C. giniculata</i> <sup>P</sup>	-	-	-	-	5	62,5	3	37,5	8
<i>C. lunata</i> <sup>P</sup>	4	66,7	2	33,3	-	-	-	-	6
<i>Chaetomium globosum</i> <sup>P; A</sup>	4	57,1	-	-	3	42,9	-	-	7
<i>Fusarium subglutinans</i> <sup>P</sup>	2	66,7	1	33,3	-	-	-	-	3
<i>F. incarnatum</i> <sup>P</sup>	3	75,0	-	-	1	25,0	-	-	4
<i>Geotrichum candidum</i> <sup>P; T</sup>	19	57,5	9	27,2	4	12,2	1	3,1	33
<i>Gliocladium roseum</i> <sup>NP</sup>	6	66,7	2	22,3	1	11,0	-	-	9
<i>Hortaea werneckii</i> <sup>P</sup>	1	100,0	-	-	-	-	-	-	1
<i>Nigrospora sphaerica</i> <sup>NP</sup>	-	-	-	-	1	100,0	-	-	1
<i>Rhinocladiella aquaspersa</i> <sup>P</sup>	3	37,5	1	12,5	4	50,0	-	-	8
<i>Stachybotrys chartarum</i> <sup>P</sup>	4	80,0	-	-	1	20,0	-	-	5
<i>Syncephalastrum racemosum</i> <sup>NP</sup>	3	37,5	1	12,5	4	50,0	-	-	8
<i>Syctalidium lignicola</i> <sup>P</sup>	2	100,0	-	-	-	-	-	-	2
<i>Rhizopus ozygosporus</i> <sup>P</sup>	5	41,7	4	33,4	2	16,6	1	8,3	12
<i>Rhodotorula minuta</i> <sup>P</sup>	3	75,0	-	-	1	25,0	-	-	4
<i>R. mucilaginosa</i> <sup>P</sup>	4	66,7	-	-	2	33,3	-	-	6
<i>Verticillium chlamydosporium</i> <sup>NP</sup>	7	46,7	2	13,2	5	33,4	1	6,7	15
<b>TOTAL</b>	<b>372</b>	<b>30,8</b>	<b>325</b>	<b>26,9</b>	<b>303</b>	<b>25,0</b>	<b>209</b>	<b>17,3</b>	<b>1209</b>

P: Patogênico; T: Toxicogênico; A: Alergizante; NP: Não Patogênica



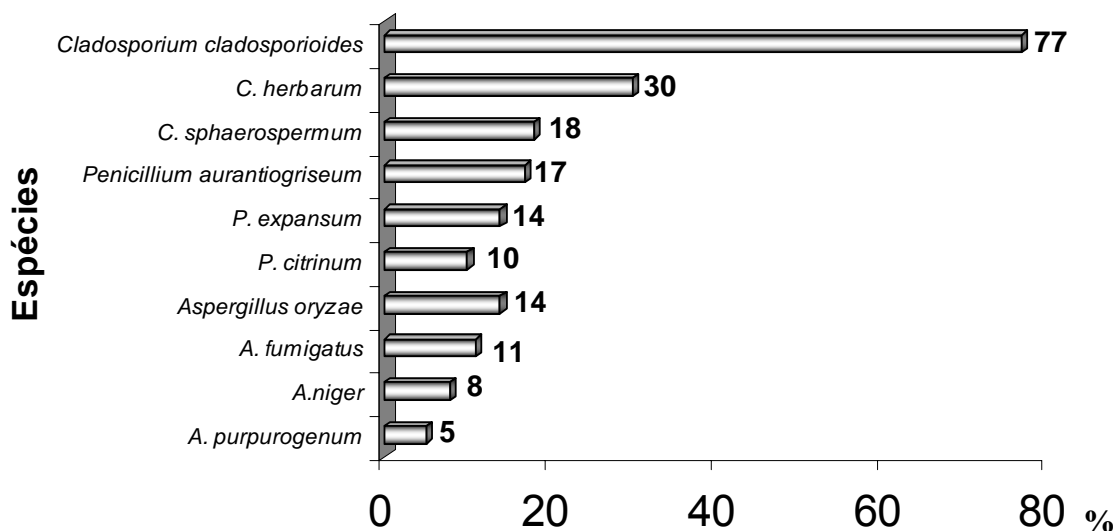
**Figura 1:** Distribuição de unidades formadoras (média  $\pm$  desvio padrão) de colônias isoladas dos dois ambientes da UTI neonatal antes e após a limpeza.



**Figura 2:** Distribuição de UFC (média  $\pm$  desvio-padrão) dos gêneros *Cladosporium*, *Penicillium* e *Aspergillus* antes e após a limpeza dos dois ambientes (A e B) da UTI neonatal.

A principal espécie isolada do ar da UTI neonatal foi *Cladosporium cladosporioides* (Fres.) de Vries que esteve presente em 15,4% das amostras, correspondendo a 186 UFC, seguida por *Penicillium aurantiogriseum* Dierckx com 132 UFC (10,9%) e *Aspergillus oryzae* (Ahlburg) Cohn com 113 UFC (9,3%) (Tabela 1). Essa mesma espécie foi isolada em 80% dos filtros dos condicionadores de ar, seguida por *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link: Fr com 30%. Destacam-se ainda *Penicillium decubens* Thom e *Aspergillus oryzae*

ambos com aproximadamente 20% (Figura 3), fungos estes também encontrados no ar.



**Figura 3:** Principais espécies de fungos isolados dos filtros dos condicionadores de ar dos dois ambientes da UTI neonatal do Hospital Universitário de Maceió, AL.

## DISCUSSÃO

Foi encontrada diferença significativa ( $< 0,05$ ) entre os ambientes estudados, sendo o ambiente A com média de UFC superior ao ambiente B. Devido neste local a qualidade do ar ser inferior as condições encontradas no ar condicionado do ambiente B.

O número de UFC aumentou após a higienização para os fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Sendo a realização da limpeza da UTI neonatal de maneira inadequada para redução da contagem de unidades formadoras de colônias.

Segundo Lacaz et al.(2002), os esporos de *Penicillium* e *Aspergillus* podem ser encontrados em todos os ambientes espalhados pelo ar, portanto apresentam uma grande distribuição. Kern e Blevins (1999) relatam que o perigo da inalação de conídios desses fungos reside na capacidade de produzir em indivíduos debilitados, patologias conhecidas como peniciliose e aspergilose, as quais são caracterizadas por doenças pulmonares, que podem se espalhar pelos vasos vizinhos, disseminando-se pelo líquido cefalorraquidiano (LCR), rins e endocárdio, sendo geralmente fatal.

O maior número de UFC observadas após a limpeza pode estar associada ao fluxo de pessoas, falta de procedimentos eficientes, a provável baixa no efeito dos detergentes e outras substâncias em eliminar esses microrganismos. Nesse contexto, Bloomfield e Scott (1997) citam vários estudos que evidenciam a ineficiência do procedimento de limpeza com apenas água e sabão sendo necessário o uso de produtos químicos com ação germicida.

O gênero *Cladosporium* foi mais freqüente com 26,8%. Resultado semelhante aos encontrados por Bernardi e Nascimento (2005) que ao avaliar

fungos anemófilos na praia de Iaranjal no Rio Grande do Sul encontrou 18,22% dos fungos pertencentes ao gênero *Cladosporium* spp.

Outros resultados semelhantes a este, foram os obtidos por Silva *et al.* (1983), que ao identificar a flora fúngica do ar e do piso de um hospital de Belo Horizonte, MG, encontrou *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aureobasidium*, *Curvularia* e *Nigrospora*, também observados neste trabalho.

No presente estudo, 41 espécies distribuídas em 23 gêneros foram isoladas dos dois ambientes da UTI neonatal, predominando *Cladosporium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. A maioria dos fungos isolados é capaz de desenvolver infecções fúngicas em pacientes imunocomprometidos, por isso são altamente indesejados em ambientes hospitalares, principalmente unidades de terapia intensiva.

Estudos realizados por Lugauskas e Kriskstaporis (2004) em hospitais e instituições médicas da Lituânia revelaram a espécie *Cladosporium cladosporioides* como o isolado mais freqüente, resultado este semelhante aos encontrados neste estudo.

No Brasil, há poucos dados referentes a microbiota fúngica em ambiente hospitalares, principalmente aqueles relacionados à identificação ao nível de espécies.

O isolamento da espécie *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb ex-Link) Hughes (atualmente *S. ata*) no ambiente estudado é preocupante, pois esse fungo passou a ganhar relevância quando um relatório da CDC divulgou um surto de pneumonia hemorrágica idiopática (conhecido como hemosiderose pulmonar) em oito crianças da cidade de Cleveland, EUA (VESPER E VESPER, 2002).

A mesma espécie fúngica (*Cladosporium cladosporioides*) encontrada nos ambientes da UTI neonatal, também foi encontrada em 80% dos isolados provenientes dos filtros dos condicionadores de ar. Morbim e Salmato (2006) avaliando a microbiota fúngica dos condicionadores de ar nas unidades de terapia intensiva de Teresina, PI observou a presença de *Aspergillus niger* em 60% dos filtros dos condicionadores de ar das UTIs, fungo este também identificado neste estudo porém com menor freqüência.

O ar condicionado projeta microrganismos que ficam retidos nos filtros e água estagnada e, aliado ao fenômeno acumulativo de 90% do ar reciclado, promove um aumento do número de microrganismos na ordem de 1.000 a 100.000 vezes comparado ao ambiente externo (LACERDA, 2000).

O monitoramento da contaminação ambiental fúngica deve ser recomendado para detectar aumentos da densidade de conídios, avaliar a eficiência da filtração do ar e a desinfecção de instrumentos, equipamentos e mobiliários pertencentes a locais como, hospitais, clínicas, consultórios e outros (NESSA *et al.*, 2001).

O isolamento da microbiota fúngica do ar é importante para identificar a presença de possíveis fungos patogênicos. Além disso, a contagem de esporos fúngicos no ar é um indicador usado para medir o grau de poluição do ar.

## **CONCLUSÃO**

O crescimento de colônias fúngicas e a presença de fungos patogênicos foram evidenciados tanto antes como depois da limpeza da UTI neonatal, demonstrando a necessidade de um monitoramento constante para se ter o controle desses microrganismos em ambientes hospitalares, principalmente em unidades de terapia intensiva onde há a presença de pacientes imunocomprometidos propícios a desenvolver infecções fúngicas.

## 11.2 Aspectos Macroscópicos e Microscópicos dos Gêneros Identificados



*Cladosporium* sp.



*Penicillium* sp.



*Aspergillus* sp.



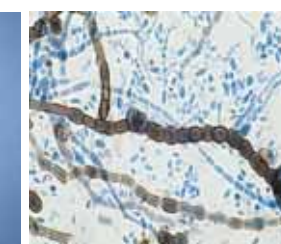
*Alternaria* sp.



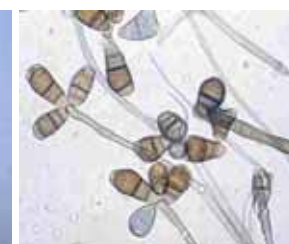
*Acremonium* sp.



*Monilia* sp.



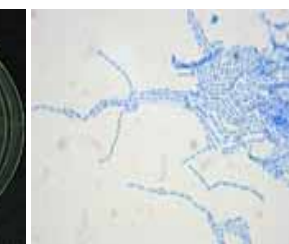
*Aureobasidium* sp.



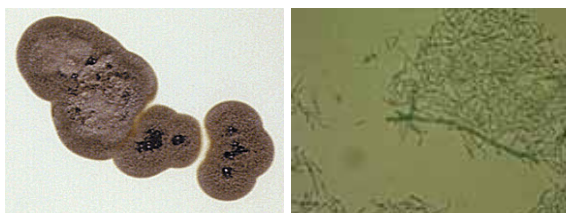
*Curvularia* sp.



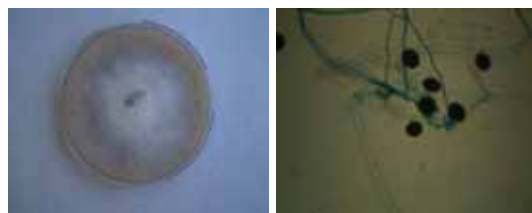
*Chaetomium* sp.



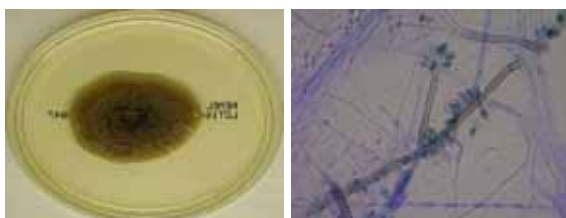
*Geotrichum* sp.



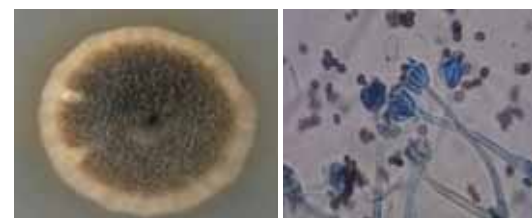
*Hotaea werneckii*



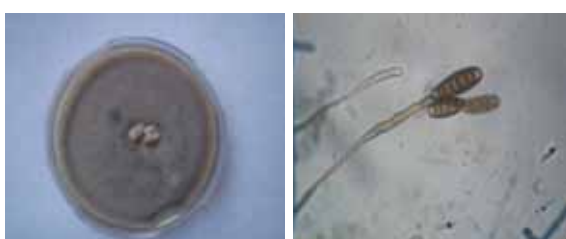
*Nigrosora* sp.



*Rhinocladiella* sp.



*Stachybotrys* sp.



*Bipolares* sp.



*Fusarium* sp.



*Verticillium* sp.



*Gliocladium* sp.



*Syctalidium* sp.