

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PNEUMOLÓGICAS

Monitoramento de fungos no ar de unidades de terapia intensiva

Aluna: Cristiane Boff

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Comarú Pasqualotto

Dissertação de Mestrado

2011

CIP - Catalogação na Publicação

Boff, Cristiane
Monitoramento de fungos no ar de unidades de
terapia intensiva / Cristiane Boff. -- 2011.
61 f.

Orientador: Alessandro Comarú Pasqualotto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2011.

1. Fungos no ar . 2. Aspergillus spp. I.
Pasqualotto, Alessandro Comarú, orient. II. Título.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
1. MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO AR.....	2
1.1 O coletor de Andersen®.....	2
1.2 Recomendações para Concentração de Fungos em Ambientes Fechados.....	3
1.3 Principais Gêneros Fúngicos Presentes no Ar.....	5
1.3.1 <i>Alternaria</i> spp.....	5
1.3.2 <i>Aspergillus</i> spp.....	6
1.3.3 <i>Cladosporium</i> spp.....	8
1.3.4 <i>Curvularia</i> spp.....	8
1.3.5 <i>Fusarium</i> spp.....	9
1.3.6 Fungos Filamentosos Estéreis.....	10
1.3.7 Leveduras.....	10
1.3.8 <i>Penicillium</i> spp.....	11
1.3.9 <i>Rhizopus</i> spp.....	11
2. FATORES QUE INFLUENCIAM A CONCENTRAÇÃO DE CONÍDIOS DE FUNGOS NO AR.....	12
2.1 Parâmetros Físicos das Partículas.....	12
2.2 Parâmetros Ambientais.....	13

2.2.1 Influência da Temperatura, Umidade, Chuvas, Ventos e Atividade de Água	13
2.2.2 Influência das Estações do Ano.....	14
2.3. Outros Fatores que influenciam a Qualidade do Ar.....	15
2.3.1 Ar Condicionado.....	15
2.3.2 Surtos Hospitalares e Construções.....	16
3. IMPORTÂNCIA CLÍNICA DO MONITORAMENTO DO AR EM HOSPITAIS.....	17
3.1 Patogênese das Infecções Fúngicas Respiratórias.....	17
3.2 Aspergilose Invasiva.....	18
3.3 Pacientes Mais Suscetíveis a Infecções Fúngicas	19
3.3.1 Pacientes Neutropênicos	19
3.3.2 Pacientes Não-Neutropênicos.....	20
4. ESTUDOS DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO AR EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA	21
4.1 Estudos Internacionais.....	21
4.2 Estudos Nacionais.....	24
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
JUSTIFICATIVA.....	33
OBJETIVOS.....	34
APROVAÇÃO NOS COMITÊS DE ÉTICA.....	35
ARTIGO 1.....	36
ARTIGO 2.....	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

AI	Aspergilose Invasiva
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACGIH	<i>American Conference Governmental Industrial Hygienists</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Aw	Atividade de Água
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i>
HEPA	Filtro de Partículas Aéreas de Alta Eficiência
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
m ³	Metro cúbico
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
mm	Milímetro
NBR	Norma Brasileira
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RCS	<i>Reuter Centrifugal Sampler</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UTI	Unidades de Terapia Intensiva

RESUMO

Nos ambientes hospitalares, crescente importância têm sido dada ao estudo dos bioaerossóis, principalmente em áreas onde pacientes suscetíveis a doenças causadas pela exposição a estes elementos estejam internados, como unidades hematológicas e de terapia intensiva. Entre os diferentes métodos utilizados para amostrar o ar no ambiente hospitalar, destaca-se o uso de amostradores que permitem a impactação direta de partículas em placas de ágar, a exemplo do coletor de Andersen[®]. Estes equipamentos fornecem informações qualitativas e quantitativas quanto à presença de conídios fúngicos nos ambientes avaliados, sendo possível relatar o resultado em unidades formadoras de colônia por metro cúbico de ar. Apesar de diversos estudos terem sido realizados para avaliar a qualidade do ar em ambientes internos, ainda não foi estabelecida uma padronização para níveis aceitáveis de fungos em ambientes não equipados com filtros de alta eficiência (HEPA). Além disso, a concentração de fungos nos ambientes sofre influências de diversas variáveis, incluindo as características físicas das partículas, fatores ambientais e outras situações, como a presença de obras e tipos de filtro de ar condicionado. Neste estudo, avaliou-se a qualidade do ar de duas unidades de terapia intensiva em hospitais universitários de Porto Alegre, no intuito de estudar a quantidade de fungos presentes nestas unidades, correlacionando os achados com variáveis ambientais e com o isolamento de fungos a partir de amostras clínicas.

ABSTRACT

Increasing importance has been given to the study of bioaerosols in hospital environments, mainly in areas where patients that are susceptible to diseases caused by fungal exposure are admitted, such as in hematological units and in the intensive care. Among the different methods used to sample the air in a hospital environment, emphasis has been put on the use of samplers that allow direct impaction of particles in agar plates such as the Andersen sampler. This equipment provides qualitative and quantitative information regarding the presence of fungal conidia in the environment, providing results in terms of number of colony forming units per m³ of sampled air. However, guidelines on how to interpret fungal concentrations in areas that are not equipped with high efficiency particulate air filters (HEPA) are not available. It is well known the concentration of fungi in the environments is influenced by several variables, including the physical characteristics of the particles, environmental factors and others, such as the presence of construction works and air conditioning filter types. In this study, we evaluated the air quality of three intensive care units in university hospitals in Porto Alegre. Our aim was to study the quantity of fungi present in these units, correlating the findings with environmental variables and the recovery of fungi from clinical samples.

INTRODUÇÃO

Os bioaerossóis são partículas dispersas no ar de ambientes internos e externos, que variam de 0,3 – 100 μm , podendo ser compostos por bactérias, vírus, pólenes, fragmentos celulares, subprodutos do metabolismo microbiano ou elementos fúngicos.¹ Os conídios fúngicos constituem grande parte do material biológico suspenso no ar e o seu monitoramento pode fornecer informações epidemiológicas importantes quanto aos gêneros presentes e sua quantificação.² As concentrações de fungos no ambiente sofrem influências de diversos fatores, incluindo variáveis ambientais (como temperatura e umidade), fatores físicos (forma, tamanho e densidade das partículas), além de outras situações que podem aumentar a quantidade de conídios no ambiente.

Diversos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de avaliar a qualidade do ar inalado. Nos ambientes externos, os estudos têm usualmente relacionado à quantidade de fungos com a presença de alergias respiratórias. Já os estudos conduzidos em locais internos, como os ambientes hospitalares, costumam associar a presença de fungos com o risco de doenças fúngicas invasivas, particularmente em indivíduos suscetíveis, como os internados em unidades hematológicas e de terapia intensiva.

Apesar da avaliação da concentração de fungos no ar não ser uma prática rotineira recomendada em hospitais, as comissões de controle hospitalar devem avaliar as situações onde esta prática é recomendada, como na ocorrência de surtos (construções e reformas) e no monitoramento da qualidade do ar em unidades de transplante de células tronco – hematopoéticas, terapia intensiva e centros cirúrgicos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. MONITORAMENTO DA QUALIDADE DO AR

1.1 O coletor de Andersen[®]

Vários amostradores de ar têm sido utilizados para avaliar a concentração de conídios no ar de ambientes internos e externos. Os equipamentos possuem diferentes metodologias para detectar e quantificar os gêneros fúngicos, incluindo: impactação direto no ágar, centrifugação, filtração, precipitação eletrostática, sedimentação gravitacional, entre outros.³

O coletor de Andersen[®], de seis estágios, utiliza o princípio de impactação direto no ágar e é recomendado principalmente para o monitoramento de ambientes fechados. Avalia qualitativamente e quantitativamente o ar selecionando partículas biologicamente viáveis. É composto por uma torre cilíndrica com seis estágios ligada a uma bomba de vácuo de aspiração contínua. Em cada estágio é colocado uma placa de Petri com meio de cultura e sobre ela um disco de metal com 400 orifícios que variam de diâmetro conforme o estágio (0,25 - 1,81 mm) (Figura 1).⁴ O ar é aspirado pelo equipamento e passa pelos estágios com velocidades sucessivamente mais altas, do estágio 1 ao estágio 6, sendo que partículas sucessivamente menores são inercialmente impactadas nas placas de ágar. Isto propicia a seleção de partículas conforme o seu tamanho, simulando a deposição nas vias aéreas.⁵



Figura 1. Coletor de Andersen[®]. Equipamento que utiliza o princípio de impactação direto no ágar de partículas biologicamente viáveis suspensas no ar.

Quando uma partícula entra em um fluxo de ar, seja no trato respiratório de um hospedeiro ou em um amostrador de ambiente (Andersen[®]), é transferida a ela uma energia inercial. Quanto maior o diâmetro aerodinâmico, maior é a energia absorvida pela partícula e com isso sua deposição concentra-se na parte superior do trato respiratório ou nos primeiros estágios do amostrador. Já as partículas menores evitam o impacto e se mantêm no fluxo de ar, sendo que partículas de até 4 µm conseguem se depositar nos pulmões ou nos estágios subsequentes do amostrador.^{5,6}

Após a coleta, as placas de Petri são retiradas do equipamento e incubadas em estufa, para posterior identificação e quantificação fúngica. A temperatura de incubação das placas depende do tipo de microrganismo que se deseja isolar, isto é, 25°C para fungos, 35°C para bactérias e 35 - 40°C para isolamento de *Aspergillus* seção *Fumigati*. Os resultados são expressos em número de unidades formadoras de colônia (UFC) por metro cúbico (m³) de ar.

Um estudo comparou o coletor de Andersen[®] de seis estágios com o *Reuter Centrifugal Sampler* (RCS) e concluiu que o coletor de Andersen[®] foi mais efetivo na recuperação de fungos do ar, tendo permitido o isolamento de 28 gêneros diferentes, em comparação com o RCS, que resultou no isolamento de apenas 7 gêneros.⁷

1.2 Recomendações para Concentração de Fungos em Ambientes Fechados

Atualmente, não existe uma quantificação máxima permitida de fungos em ambientes hospitalares sem uso de Filtros de Partículas Aéreas de Alta Eficiência (HEPA). Isto se deve, provavelmente, por ser desconhecido o efeito da exposição de pacientes a diferentes concentrações de conídios fúngicos.⁸

Em vista disto, a *American Conference Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH), uma organização voluntária de profissionais em higiene industrial de instituições governamentais ou educacionais dos Estados Unidos, e a *Health Canada*, uma agência governamental canadense, forneceram orientações detalhadas sobre a interpretação de dados de amostras de ar, como seguem:⁸

- *Fungos encontrados em ambientes internos devem ser um reflexo dos fungos presentes no ambiente externo, sendo que o movimento do ar deve ocorrer do ambiente externo para o interno;*
- *Fungos identificados em amostras de ar internas devem estar em menores concentrações do que no ambiente externo. Se as concentrações internas forem maiores ou foram identificados gêneros diferentes ao ambiente externo, deve então haver suspeita de fonte de disseminação interna;*
- *Uma espécie específica de fungo não deve predominar em ambientes internos, exceto espécies que possam refletir um tipo dominante externo, em determinado clima e época do ano;*
- *É importante determinar a umidade nos ambientes internos.*

Ainda existem várias questões a serem solucionadas antes que uma padronização seja estabelecida. Além de não estar claro os níveis seguros de exposição a fungos para pacientes suscetíveis, faltam protocolos para coletas (intervalo e número de amostras, volume de ar coletado e locais para coleta), como também padronização da técnica (meio de cultura utilizado, temperatura de incubação, tempo de leitura das placas de cultura).⁹

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na resolução nº 9, de 16 de janeiro de 2003 sobre “Orientação Técnica elaborada por Grupo Técnico Assessor sobre

Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo”, padronizou o valor máximo recomendável para contaminação microbiológica em ≤ 750 UFC/m³ 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. No entanto, esta recomendação não é específica para ambientes hospitalares.¹⁰ Como também, na portaria nº 3.523/GM, determina medidas básicas referentes aos procedimentos de verificação visual do estado de limpeza, remoção de sujidades por métodos físicos e manutenção do estado de integridade e eficiência de todos os componentes dos sistemas de climatização, para garantir a qualidade do ar de interiores e prevenção de riscos à saúde dos ocupantes de ambientes climatizados.¹¹

1.3 Principais Gêneros Fúngicos Presentes no Ar

A seguir serão relatados os principais gêneros fúngicos encontrados no ar ambiente, bem como sua patogenicidade, macromorfologia e micromorfologia. A descrição das colônias corresponde ao crescimento em ágar Sabouraud e temperatura de incubação à 25°C; a coloração azulada observada em algumas das figuras abaixo se refere ao pano de fundo utilizado quando da fotodocumentação das placas.

1.3.1 Alternaria spp

Possui distribuição mundial, sendo normalmente considerado um contaminante saprófita.⁶ Além de ser um importante alergênico, já foi descrito como agente causal de lesões cutâneas, ceratomicose, osteomielite, doenças pulmonares e infecções no septo nasal, geralmente causadas por inoculação acidental.

Macromorfologia: colônia de crescimento rápido (3-4 dias) com textura aveludosa. A colônia se apresenta lanosa, sendo inicialmente branca-acinzentada tornando-se verde-musgo com tendência ao preto. O reverso apresenta cor preta.^{6,12}



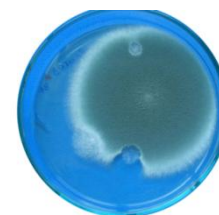
Micromorfologia: apresentam hifas demáceas septadas com numerosos dictioconídios em cadeia, formados a partir de uma hifa através de um poroconídio.¹² Os conídios (20-60 μm) possuem septos horizontais e verticais e base na forma de baquete com ápices afilados.⁶ Uma das extremidades do conídio mostra-se pontiaguda, formando um bico, geralmente seguido de outro conídio.¹²

1.3.2 *Aspergillus* spp

As espécies de *Aspergillus* são ubíquas no ambiente, podendo ser encontradas no solo, água e no ar; crescem em uma ampla variedade de materiais orgânicos.¹³ Os fungos do gênero *Aspergillus* dão origem a grande quantidade de conídios pequenos (2-6 μm), lisos ou rugosos, que penetram facilmente no sistema respiratório e nos seios paranasais, causando infecções em pacientes suscetíveis.¹⁴ A morfologia das principais espécies do gênero *Aspergillus* são apresentadas a seguir.

Aspergillus fumigatus sensu stricto

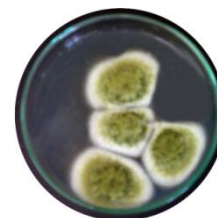
Macromorfologia: Colônia de crescimento rápido. Inicialmente, colônias de textura algodonosa e cor branca, tornando-se cinza-esverdeada e textura mais veludosa, com reverso branco ou acastanhado.¹⁴



Micromorfologia: Conidióforo liso, incolor com tendência terminal a verde; vesícula hemiesférica e com série de fiálides densa, localizada nos três quartos superiores da vesícula. Os conídios são globosos, podendo apresentar-se também na forma de rugosos ou equinulados.¹⁴

Aspergillus flavus sensu stricto

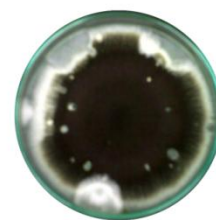
Macromorfologia: Crescimento e maturação rápida (2-3 dias) com textura arenosa de grãos grandes e coloração amarelo-esverdeada. O reverso é branco ou cinza.¹⁴



Micromorfologia: Conidióforo incolor. Vesícula hemiesférica de variadas dimensões, coroa bisseriada com formação de métulas e fiálides. Os conídios são globosos, lisos ou rugosos.¹⁴

Aspergillus niger sensu stricto

Macromorfologia: Maturação das colônias de 3-4 dias, inicialmente com textura algodoadosa, coloração branca ou amarelada que rapidamente tornam-se pretas, com textura arenosa de grânulos grandes. Reverso branco-amarelado.¹⁴



Micromorfologia: Conidióforo de coloração variável do hialino ao castanho, com paredes lisas e espessas; a vesícula é globosa com duas fileiras radiais. Os conídios são globosos, castanhos escuros, lisos ou equinulados.¹⁴

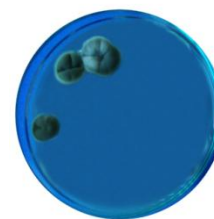
1.3.3 *Cladosporium* spp

É caracterizado como um fungo ambiental de distribuição universal, sendo um dos gêneros mais citados em estudos de monitoramento em ambientes externos, sendo facilmente veiculado pelo vento devido ao tamanho reduzido dos conídios (2-4 μm). Geralmente são considerados contaminantes, porém são relatados casos de feo-hifomicoses superficiais e profundas. Vale ressaltar que foi criado um novo gênero *Cladophialophora* para agrupar as espécies patogênicas de *Cladosporium* spp, que possuem afinidade principalmente pelo sistema nervoso central.¹²

Macromorfologia: crescimento moderadamente lento (~7 dias).

Possui textura veludosa baixa de cor verde-oliva escuro a negro.

Reverso negro.¹²



Micromorfologia: apresentam filamentos demáceos septados, com conidióforos curtos ou longos, sendo que nas extremidades apresentam conídios em cadeia. Os conídios são lisos ou verrucosos, elipsóides ou globosos, apresentando uma cicatriz hilar pigmentada, que é característico do gênero.¹²

1.3.4 *Curvularia* spp

A maioria das espécies é encontrada em países tropicais e subtropicais, contudo são consideradas de larga distribuição. São considerados primariamente como saprófitas. Clinicamente, o gênero pode ser esporadicamente implicado em casos de ceratite, sinusites, micetomas e feo-hifomicoses de distintos sítios anatômicos.¹²

Macromorfologia: colônias de crescimento rápido (3-4 dias), baixas de textura veludosa, de tom verde-oliva escuro, marrom ou preto e recoberta de um micélio algodinoso frouxo de tonalidade cinza. O reverso é preto.¹²



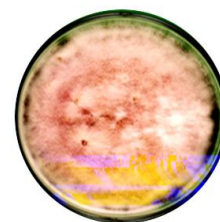
Micromorfologia: presença de hifas demáceas septadas, com conidióforos eretos, castanhos e multicelulares. Os macroconídios (20-40 μm), apresentam 4 a 5 células, são curvos, escuros, com distensão central e extremidades mais claras que o centro.^{6,12}

1.3.5 *Fusarium* spp

São microrganismos ubíquos e fitopatógenos, porém podem causar grande variedade de manifestações clínicas atingindo tecidos superficiais e profundos.¹⁴

Diversos são os quadros clínicos, tais como: ceratite, micetomas, onicomicoses e formas cutâneas. Infecções invasivas acometem pacientes imunossuprimidos.¹⁴

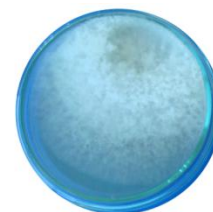
Macromorfologia: crescimento rápido (2-4 dias), as colônias são algodinosas, de coloração variando de branca a cinza, rósea ou violeta. O reverso é bastante variável, mas de modo geral, mais claro que o verso.¹⁴



Micromorfologia: hifas hialinas delgadas e septadas. Produzem micro e macroconídios a partir de fiálides em forma de fuso hialino. Os conídios são solitários, com extremidades afiladas, piriformes ou falciformes, uni, bicelulares, até cinco septos, curvos ou retos.⁶

1.3.6 Fungos Filamentosos Estéreis

Compreende um grupo heterogêneo de fungos imperfeitos, parasitos e saprófitas, conhecidos apenas por seu estágio miceliano, não apresentando conídios. Nesta ordem estão incluídos fungos que podem apresentar corpos de resistência – esclerócios, que não possuem conídios endógenos. Os esclerócios de forma variada, de marrons a negros, são geralmente pequenos, formando-se na massa miceliana.¹⁵



1.3.7 Leveduras

As leveduras fazem parte da microbiota normal do organismo, sendo também isolada no ar ambiente. As principais leveduras encontradas no ar são *Candida* spp e *Rhodotorula* spp. São associadas a infecções diversas, incluindo as sistêmicas.¹⁶

Macromorfologia: Colônias maduras em 48 horas, produzindo colônias glabras. Possuem textura cremosa e superfície lisa, sendo que colônias de *Candida* spp apresentam cor branca- bege e colônias de *Rhodotorula* spp apresentam coloração alaranjada.¹⁶



Micromorfologia: Estruturas arredondadas ou ovais, sendo que no gênero *Candida* podem ser observadas pseudohifas.¹⁶

1.3.8 *Penicillium* spp

Apresenta ampla distribuição na natureza, são ubíquos e cosmopolitas. Raramente são isolados como agente causador de ceratite, otites, sinusites, infecções urinárias, infecções pulmonares, quadros alérgicos, micotoxicoses e casos de hialo-hifomicoses.¹²

Macromorfologia: colônias de crescimento rápido (3-4 dias) inicialmente apresentam textura algodonosa baixa ou veludosa, de tom branco, que rapidamente se torna amarelo-laranja, amarelo-esverdeado, verde ou azul-esverdeado. Reverso castanho-amarelado ao castanho- avermelhado.¹²



Micromorfologia: apresenta hifas hialinas septadas, com conidióforo simples ou ramificados. Apresenta fiálides e os conídios se encontram em cadeia de extensão variável. Os conídios (2-6 μm) são esféricos, com parede lisa ou rugosa, hialino ou levemente esverdeados.¹²

1.3.9 *Rhizopus* spp

São frequentemente encontrados sobre matéria orgânica em decomposição. Podem causar infecções respiratórias, cutâneas, subcutâneas ou disseminadas; como também, causar reações alérgicas e produzir infecções gastrointestinais ao ingerir alimentos contaminados. Acometem pacientes com traumas e feridas, imunodeprimidos, diabéticos, entre outros.¹⁷

Macromorfologia: Crescimento de colônias muito rápido (2-4 dias).

Colônias de textura algodoadosa de crescimento denso e inicialmente de tom branco passando a cinza ou amarelo-acastanhado, as quais preenchem toda a superfície do meio de cultivo. Reverso branco.¹²



Micromorfologia: Presença de hifas largas típicas dos zigomicetos, com raras septações. Numerosos estolões são formados unindo grupos de esporangióforos. Sobre estes aparecem os esporangiósporos com grande quantidade de esporos em seu interior, os quais são irregulares. Apresentam estolões e rizóides, o que os diferenciam do gênero *Mucor*.¹²

2. FATORES QUE INFLUENCIAM A CONCENTRAÇÃO DE CONÍDIOS FÚNGICOS NO AR

2.1 Parâmetros Físicos das Partículas

Entre os parâmetros físicos que influenciam a concentração de conídios fúngicos no ar podemos citar o diâmetro aerodinâmico, que compreende o tamanho, forma e densidade das partículas.⁵

No ambiente externo, os conídios de fungos pequenos, de baixa densidade e de pouco peso podem chegar a longas distâncias e alturas. Já no ambiente interno, partículas pequenas de tamanho entre 1-5 μm tendem a permanecer no ar, enquanto que partículas maiores tendem a se depositar nas superfícies. A deposição ocorre quando o conídio for mais denso que o ar, sendo que sua velocidade de sedimentação será influenciada pela gravidade e resistência do ar.⁶

2.2 Parâmetros Ambientais

Os principais parâmetros ambientais que influenciam a quantidade de conídios no ar são: correntes de ar, umidade, temperatura, substratos orgânicos disponíveis, condições climáticas e variação sazonal.^{1,18}

2.2.1 Influência da Temperatura, Umidade, Chuvas, Ventos e Atividade de Água

Estudo realizado por Brenier-Pinchart *et al.* (2009) avaliando a influência de fatores externos na concentração de fungos filamentosos em unidades hospitalares da demonstrou que temperaturas >25°C, umidade >60%, presença de chuvas brandas (5-25 mm) e alta concentração de fungos no ambiente externo favorecem o aumento de conídios no ambiente interno. Enquanto que, chuvas e ventos muito fortes estão relacionados com menores concentrações de fungos no ambiente interno.¹⁹

Em estudo comparando o ar de duas unidades de transplante de células hematopoiéticas nos Estados Unidos, a ocorrência de baixas precipitações e elevadas temperaturas foi associada a maior concentração de conídios na cidade de Seattle, enquanto tal associação não se observou em Houston.²⁰ Coletivamente, estes dados apontam para a complexidade dos diversos fatores capazes de interferir na concentração ambiental de fungos, o que dificulta sobremaneira a generalização dos resultados.

Ambientes internos podem gerar novos ecossistemas, onde um número limitado de gêneros irá predominar, dependendo da umidade e nutrientes disponíveis. Isto é particularmente determinado pela atividade da água (A_w), que representa a quantidade de água livre para o crescimento fúngico nos substratos.²¹ O *Penicillium* spp se adapta facilmente ao ambiente interno por ser capaz de crescer em uma atividade de água inferior a 0,8. Já o *Cladosporium* spp

necessita de um Aw entre 0,8 e 0,9 e é capaz de crescer sob condições de mudanças marcantes da umidade, sendo o fungo mais prevalente e abundante em ambientes externos em todo o mundo.^{1,22,23}

2.2.2 Influência das Estações do Ano

Os fungos variam suas concentrações no ambiente em função de ciclos sazonais e diurnos, sendo estes específicos de cada gênero. Em locais com estações bem definidas, pode-se observar um padrão de sazonalidade dos fungos, apesar das concentrações serem influenciadas por condições climáticas e meteorológicas.²⁴

Estudo realizado no ar atmosférico na cidade de Caxias do Sul – RS com o equipamento de Burkard® encontrou, no ano de 2001, maiores concentrações de fungos nos meses de outono e, no ano de 2002, nos meses de verão.²⁵ Mezzari (2003), encontrou concentrações maiores de fungos no verão e menores no outono no ar atmosférico da cidade de Porto Alegre - RS.²⁶ Estas diferenças anuais, provavelmente, se devem à variabilidade de fatores ambientais que afetam a concentração de fungos, como temperatura, umidade e condições climáticas. Em ambos os trabalhos, os gêneros mais encontrados foram *Cladosporium*, seguido do grupo *Aspergillus/Penicillium*.^{6,26}

Panagopoulou *et al.* (2002) monitoraram departamentos de três hospitais da Grécia e encontraram maiores concentrações de fungos no verão e outono e menores no inverno, sendo que nas unidades de terapia intensiva (UTI) as concentrações de fungos variaram entre 1,3 – 7,7 UFC/m³; segundo critérios estabelecidos pelos autores, estes estavam em níveis aceitáveis (<10 UFC/m³).²⁷ Estudo realizado em uma unidade pediátrica de transplantes de células tronco hematopoiéticas em São Paulo observou maior ocorrência de propágulos fúngicos nos meses de

outono.²⁸ A mesma observação foi encontrada por Anaissie *et al.* (2003), em hospital nos Estados Unidos.²⁹

2.3. Outros Fatores que influenciam a Qualidade do Ar

2.3.1 Ar Condicionado

O uso de condicionadores de ar propicia que o ar fresco do ambiente externo entre nos ambientes internos. O processo de renovação do ar é contínuo a partir de trocas de ar realizadas pelo sistema de ventilação, que eliminam parte dos bioaerossóis, dependendo da eficiência do filtro utilizado.³⁰

A determinação da eficiência dos filtros de ar condicionado pode ser avaliada pelas normas brasileiras (NBR) da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), entre elas ABNT NBR 7256:2005 e NBR 16401:2008, sendo que somente a primeira é específica para ambientes hospitalares. Ambas classificam os filtros em grossos e finos, tendo como referencial uma norma europeia. A NBR 7256 contempla, ainda, os filtros absolutos (Tabela 1).^{31,32}

O uso de filtros HEPA reduz o risco de aspergilose invasiva (AI), mas não o elimina, pois o paciente pode ter sido colonizado antes de entrar no hospital.³³ Fatores relacionados ao hospedeiro, em especial o grau de imunidade do mesmo, são importante determinantes da frequência de AI.

Tabela 1. Classificação dos filtros de ar, segundo NBR 7256 e 16401.^{31,32}

Tipo de Filtro	Classe	Eficiência de Filtração - Ef (%)
Filtros Grossos*	G1	$50 \leq Ef < 65$
	G2	$65 \leq Ef < 80$
	G3	$80 \leq Ef < 90$
	G4	$90 \leq Ef$
Filtros Finos**	F5	$40 \leq Ef < 60$
	F6	$60 \leq Ef < 80$
	F7	$80 \leq Ef < 90$
	F8	$90 \leq Ef < 95$
	F9	$95 \leq Ef$
Filtros Absolutos***	A1	$85 \leq Ef < 94,9$
	A2	$95 \leq Ef < 99,96$
	A3 (HEPA)	$99,97 \leq Ef$

* Retenção de partículas acima de 5 μm

** Retenção de partículas entre 1 - 5 μm exclusive

*** Retenção de partículas abaixo de 1 μm

2.3.2 Surtos Hospitalares de AI e Construções

Surtos de AI são frequentemente associados com construções ou reformas nos hospitais. Um estudo avaliou 53 surtos de AI em hospitais e observou que 49,1% dos casos prováveis ou possíveis de infecções por *Aspergillus* spp estavam relacionados a construções e reformas nos hospitais e 17% estavam relacionados com problemas no sistema de refrigeração. O ar foi a fonte de transmissão mais comum, sendo o trato respiratório inferior o principal local de infecção,

seguido de feridas operatórias e infecções de pele. *Aspergillus* seção *Fumigati* e *Aspergillus* seção *Flavi* estiveram relacionados com a maioria dos casos de AI. Nos estudos que realizaram monitoramento ambiental, durante os períodos de surtos a concentração de conídios variou de 0 – 100 UFC/m³.³⁴

Construções hospitalares têm sido relacionadas com um aumento na contagem total de fungos no ar.³⁵ Considerando o fato do solo ser um reservatório de fungos, o processo de escavação e construção aumentam a quantidade de conídios fúngicos no ar, inclusive de *Aspergillus* spp.

Curtis *et al.* (2005) monitoraram o ar de várias unidades em hospital de Chicago, Estados Unidos, durante período de grandes reformas. A concentração média de *Aspergillus* spp foi maior dentro do hospital do que fora durante as reformas, sugerindo que fontes de disseminação internas de *Aspergillus* spp podem existir no hospital.³⁶

A efetividade do uso de quartos com filtros HEPA foi testada em hospital da Finlândia durante período de reforma. Durante o estudo, todas as amostras externas aos quartos foram positivas para *Aspergillus* seção *Fumigati*, enquanto que as amostras coletadas dentro dos quartos foram 97% negativas para *Aspergillus* spp. Nenhum paciente apresentou AI durante o período, deixando claro a proteção que esse tipo de filtro fornece aos pacientes.³⁷

3. IMPORTÂNCIA CLÍNICA DO MONITORAMENTO DO AR EM HOSPITAIS

3.1 Patogênese das Infecções Fúngicas Respiratórias

Os conídios fúngicos são inalados durante a respiração e o seu tamanho tem relação direta com o local de deposição no trato respiratório. Os conídios >10 µm atingem até a nasofaringe e são associados com sintomas oculares e nasais e conídios <10 µm, especialmente

aqueles <6 µm podem alcançar o trato respiratório inferior, como é o caso dos conídios de *Aspergillus* spp (2-3 µm), que conseguem penetrar até os alvéolos pulmonares.¹⁸

Após inalados, a primeira linha de defesa do organismo contra os fungos são as mucosas íntegras e função macrocítica e neutrofílica normais, onde os conídios são removidos com a ajuda do epitélio mucociliar ou fagocitados por macrófagos.³⁸

3.2 Aspergilose Invasiva

No caso dos conídios de *Aspergillus* spp penetrarem até o trato respiratório inferior, eles podem ser removidos pelos mecanismos de defesa citados acima, ou podem causar manifestações clínicas diversas.

As formas alérgicas de aspergilose manifestam-se usualmente por aspergilose broncopulmonar alérgica ou rinosinusite alérgica; tendem a afetar indivíduos atópicos ou com asma e a se manifestar por infiltrados pulmonares recorrentes, bronquiectasias e eosinofilia.⁴ Já a AI é uma doença granulomatosa grave e evolutiva do parênquima pulmonar, causando pneumonia necrosante com risco de hemoptise, disseminação sistêmica e morte. A AI envolve os pulmões em mais de 90% dos casos, sendo os seios paranasais o segundo local mais comumente envolvido.^{4,33} Aspergilose pode também se manifestar como doença pulmonar cavitária crônica que pode progredir para a formação de bolas fúngicas, geralmente em seqüela de tuberculose pulmonar.⁴

Os agentes etiológicos mais frequentes de AI são *Aspergillus* seção *Fumigati*, *Aspergillus* seção *Flavi* e *Aspergillus* seção *Nigri*, sendo que o diagnóstico é usualmente realizado a partir da combinação de achados clínicos e radiológicos, com dados microbiológicos e demonstração histológica de invasão tecidual pelo fungo.^{33,39} Dada a ubiquidade do fungo, é problemática a

distinção de colonização e infecção por *Aspergillus* spp, onde um resultado positivo de cultura ou microscopia não é suficiente para estabelecer um diagnóstico. Técnicas mais promissoras como ELISA para detecção de galactomanana e PCR (reação em cadeia da polimerase) têm feito com que AI seja diagnosticada de modo mais precoce em uma gama diversa de pacientes.^{33,40}

O desenvolvimento de AI depende da inter-relação da habilidade do hospedeiro em resistir à infecção, da virulência do organismo e da concentração de propágulos fúngicos.³³

3.3 Pacientes Mais Suscetíveis a Infecções Fúngicas

3.3.1 Pacientes Neutropênicos

O isolamento de fungos filamentosos em amostras clínicas tem sido observado mais frequentemente nos pacientes imunocomprometidos, sendo o *Aspergillus* o gênero mais recuperado. Outros fungos potencialmente patogênicos são *Fusarium* spp, *Mucor* spp e *Scedosporium* spp.⁴¹

No grupo dos pacientes imunocomprometidos suscetíveis a infecções invasivas por fungos podemos citar os pacientes transplantados de órgãos sólidos e aqueles em uso de terapias imunossupressoras e quimioterapias.^{41,42} Esses pacientes diferem quanto ao tipo de defeito nos mecanismos de defesa, sendo que em pacientes com malignidades hematológicas a quimioterapia induz à neutropenia, enquanto que em pacientes transplantados o uso de terapia imunossupressora causa uma disfunção nas células T e no processo de fagocitose.⁴² Nos pacientes neutropênicos, o risco de desenvolver AI está relacionado com o período prolongado de neutropenia (contagem granulocítica $< 500 \mu\text{L}^{-1}$ por mais de 20 dias), atingindo um platô de 70% após 34 dias de granulocitopenia.⁴¹

3.3.2 Pacientes Não-Neutropênicos

Embora neutropenia seja reconhecido como o principal fator de risco para desenvolvimento de AI, pacientes críticos em UTIs têm sido cada vez mais diagnosticados com infecções fúngicas invasivas.^{38,40} Fazem parte deste grupo de não-neutropênicos os pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) em uso de altas doses de corticosteróides sistêmicos nas últimas 3 semanas; bem como pacientes com insuficiência renal crônica com terapia de substituição renal, cirróticos, pacientes com insuficiência hepática aguda e aqueles com diabetes melito.^{40,43}

O risco aumentado de AI em pacientes críticos de UTI pode ser explicado pela presença de modificações no sistema imune destes pacientes, observando-se uma desativação dos macrófagos e alterações da resposta celular. Em adição, o uso de corticosteróides promove redução na quantidade e ação dos macrófagos, diminuindo seu recrutamento para os locais de inflamação e dificultando a fagocitose e o processamentos de antígenos.^{38,44} Foi relatado que o uso de corticosteróides estimula o crescimento de *Aspergillus* seção *Fumigati* *in vitro*, possivelmente via proteína de ligação ao esterol dos fungos.⁴⁵ Além disso, um estudo recente mostrou que o *Aspergillus* seção *Fumigati* é capaz de produzir biofilme *in vivo*, o que possibilita a persistência crônica do fungo nos pulmões, no caso de pacientes com uso de ventilação mecânica.¹ Coletivamente, estas variáveis podem elevar o risco de aspergilose em pacientes admitidos em UTIs.

As características clínicas e epidemiológicas da AI diferem sobremaneira entre pacientes neutropênicos e não-neutropênicos; por exemplo, pacientes não-neutropênicos podem se apresentar sem febre, particularmente quando do uso de corticosteróides, havendo também menor formação de doença nodular pulmonar nesses pacientes.⁴⁶

Geralmente o diagnóstico de AI é tardio em pacientes de UTI, principalmente devido à baixa suspeita clínica. Os critérios diagnósticos usualmente empregados para AI, desenvolvidos pelo EORTC/MSG,⁴⁷ são pouco aplicáveis a pacientes não-neutropênicos, tendo sido desenvolvidos primariamente para pacientes com anormalidades hematológicas. No cenário de UTI, outro problema comumente enfrentado é a interação entre drogas antifúngicas e outras comumente administradas para pacientes criticamente enfermos.⁴³

A epidemiologia da AI na UTI revela uma incidência variável, de 0,3% a mais de 31%.^{13,40} Cerca de 1-2% do total de casos fatais por AI ocorrem em pacientes com DPOC, apesar de muitos estudos sugerirem que esta incidência é subestimada.⁴⁵ A taxa de mortalidade global de AI em pacientes com DPOC relatadas na literatura é alta, chegando a 90%.⁴⁶ À exceção das infecções por *Candida* spp, infecções fúngicas invasivas causadas por outros fungos são encontradas raramente em UTI. Fusariose, zigomicose e criptococose como também fungemias por *Geotrichum* spp ou *Trichosporum* spp são descritas em pacientes com vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), bem como em transplantados.⁴³

4. ESTUDOS DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO AR EM UNIDADES DE TERAPIA INTENSIVA

4.1 Estudos Internacionais

Vários hospitais do mundo realizam o monitoramento ambiental em seus estabelecimentos. Em paralelo à grande diversidade de equipamentos disponíveis no mercado, não existe uma padronização de metodologia utilizada pelos diferentes pesquisadores, havendo, assim, muita variabilidade entre os estudos na área.

O monitoramento do ar de dois hospitais, localizado no norte e sul da China,⁴⁸ que incluíam quatro UTIs, isolou principalmente os gêneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* e *Fusarium*. A concentração média de fungos para as duas UTIs do hospital do norte foi 84 e 115 UFC/m³, enquanto que o hospital do sul apresentou médias de 7,0 e 139,0 UFC/m³. A UTI que apresentou menores concentrações de fungos possuía filtro de ar condicionado com melhor eficiência de filtragem. Kim *et al*,⁴⁹ encontrou praticamente os mesmos gêneros fúngicos em setores de um hospital na Korea que incluíam UTI, centro cirúrgico e áreas sociais. Na UTI, os principais gêneros isolados (*Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Alternaria*) foram encontrados em maiores concentrações no ambiente interno quando comparado ao ambiente externo.

Alguns estudos buscaram o monitoramento principalmente de espécies de *Aspergillus* no ambiente hospitalar. Estudo realizado em Hospital de Bogotá – Colômbia buscou identificar possíveis áreas de risco para os pacientes, devido a um aumento de casos de AI em pacientes transplantados.⁵⁰ As áreas com maiores concentrações de *Aspergillus* spp foram as salas de cirurgia (média de 7,0 UFC/m³), seguido da UTI (4,3 UFC/m³) e unidade de transplante (4,0 UFC/m³).

Brunetti *et al*,⁵¹ monitoraram o ar durante dois anos em três hospitais na Itália, e o fungo mais isolado foi *Aspergillus* spp, sendo que na UTI a média encontrada foi 3,4 UFC/m³, variando entre 2-11 UFC/m³. Cabe ressaltar que a temperatura de incubação das placas foi de 37°C.

Panagopoulou *et al*,⁵² monitoraram o ar da UTI pediátrica e outros setores de um hospital na Grécia. A concentração de fungos potencialmente patogênicos variou entre 0-56 UFC/m³, sendo que a média encontrada na UTI foi de 7,7 UFC/m³. Os principais fungos encontrados foram, em ordem decrescente: *Aspergillus* seção *Nigri*, *Aspergillus* seção *Flavi* e *Aspergillus*

seção *Fumigati*, seguido de outros. Em pesquisa realizada pelo mesmo grupo em três hospitais na Grécia em regiões geográficas distintas,²⁷ repetidamente os fungos mais isolados foram *Aspergillus* seção *Nigri*, seguido por *Aspergillus* seção *Flavi* e *Aspergillus* seção *Fumigati*. Em dois destes hospitais, a UTI foi o ambiente menos contaminado, em comparação com outros setores. Elevações nas concentrações de fungos coincidiram com períodos de reformas.

Mahieu *et al.*,⁵³ observou a relação entre reformas e concentração de conídios de *Aspergillus* no ar de UTI neonatal em hospital na Bélgica. Antes da reforma a concentração de *Aspergillus* foi de 11 UFC/m³, variando entre 0-30 UFC/m³, sendo que durante a reforma a concentração variou entre 126- 397 UFC/m³.

Dois casos de AI foram relatados em pacientes com DPOC em uso de altas doses de corticosteróides em uma UTI na Alemanha. Os casos ocorreram após as contagens de *Aspergillus* spp terem aumentado para >100 UFC/m³ nesta unidade, sugerindo uma possível relação entre o ambiente e a fonte de infecção.⁵⁴

A associação de variáveis com a concentração de fungos nos ambientes também foram avaliadas. Tang *et al.*,⁵⁵ encontraram em hospital na China associação entre atividades humanas dentro dos ambientes e concentração de conídios, sendo que a concentração de fungos aumentou após os pacientes receberem visitas na UTI.

Falvey & Streifel,³⁵ em estudo realizado durante 10 anos em um hospital de Minnessota, Estados Unidos, relataram que a menor concentração de fungos, em especial *Aspergillus* spp, ocorreu em áreas com filtros HEPA. Quando as amostras foram incubadas a 25°C, observou-se que o ambiente externo tinha 32 vezes mais fungos, quando comparado com a UTI.

4.2 Estudos Nacionais

O monitoramento de ambientes hospitalares, principalmente em UTIs, são escassos na literatura. A maioria dos estudos utiliza a técnica de sedimentação espontânea, impossibilitando a quantificação dos fungos em UFC/m³.

Gaio *et al.*,⁵⁶ identificaram 10% de *Aspergillus* seção *Fumigati* nas amostras de ar de UTI e centro cirúrgico de um hospital de Santa Catarina, pelo método de sedimentação espontânea. Foi observado aumento na concentração de fungos, nestas unidades, durante período inicial das reformas.

Cordeiro *et al.*,⁵⁷ avaliaram a presença de leveduras no ar de ambientes hospitalares, incluindo UTIs, e observaram que o gênero mais prevalente foi *Candida*, especialmente *C. parapsilosis*, seguida de *C. tropicalis* e *C. albicans*. Outras leveduras foram também encontradas, como *Rhodotorula* spp, *Saccharomyces* spp e *Trichosporon* spp.

Os gêneros *Penicillium* e *Cladosporium* foram os mais prevalentes em outros estudos que avaliaram o ar de UTI em hospitais no Brasil.^{58,59,60}

O equipamento de Andersen[®] foi utilizado nos dois estudos, a seguir, relatados.

Quadros *et al.*,⁶¹ isolaram 10 diferentes gêneros em duas UTIs (adulto e neonatal) e em duas salas de centro cirúrgico em hospital de Santa Catarina e os fungos mais encontrados foram *Penicillium* spp, *Aspergillus* spp e *Cladosporium* spp. A média de UFC/m³ na UTI adulto no período da manhã e tarde foram, respectivamente, 86 e 191 e UTI neonatal 62 e 351. No centro cirúrgico foram encontrados 133 UFC/m³ e 160 UFC/m³ para as salas 1 e 2, respectivamente. Todas as concentrações estiveram dentro dos limites aceitáveis da legislação vigente no Brasil e em menores concentrações que o ambiente externo.

Martins-Diniz *et al.*,² em hospital de Araraquara, São Paulo, encontraram uma concentração média para fungos de 317,1 UFC/m³ no ar das UTIs adulto e neonatal, sendo o gênero *Cladophialophora* o mais prevalente. Os valores estiveram abaixo da média encontrada no ambiente externo (454,6 UFC/m³).

Tavora *et al.*,⁷ compararam a concentração de fungos em UTI com a de quartos com filtros HEPA e áreas naturalmente ventiladas, utilizando dois amostradores de ar (Andersen[®] e Reuter Centrifugal Sampler[®]). Os principais gêneros encontrados foram: *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladophialophora*. Nas áreas com filtros HEPA, o nível de conídios foi menor, quando comparado às áreas sem estes filtros. O equipamento de Andersen[®] mostrou-se superior para avaliação qualitativa, pois detectou mais gêneros que seu comparador.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Cabral JP. Can we use indoor fungi as bioindicators of indoor air quality? Historical perspectives and open questions. *Sci Total Environ.* 2010;408(20):4285-4295.
- 2- Martins-Diniz JN, da Silva RA, Miranda ET, Mendes-Giannini MJ. [Monitoring of airborne fungus and yeast species in a hospital unit]. *Rev Saude Publica.* 2005;39(3):398-405.
- 3- Morris G, Kokki MH, Anderson K, Richardson MD. Sampling of *Aspergillus* spores in air. *J Hosp Infect.* 2000;44(2):81-92.
- 4- Tietbohel CN. As doenças respiratórias ocupacionais pela poeira na armazenagem de grãos vegetais. 147f. Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Pneumologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- 5- Dias JW. Amostrador de Bioaerossol de 6 estágios – Manual de operação. Rio de Janeiro, 2006.

- 6- Zoppas BCDA. Caracterización del contenido fúngico atmosférico de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. 461f. Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de León, Espanha, 2005.
- 7- Távora LG, Gambale W, Heins-Vaccari EM, Arriagada GL, Lacaz CS, Santos CR, *et al.* Comparative performance of two air samplers for monitoring airborne fungal propagules. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36(5):613-616.
- 8- Storey E, Dangman KH, Schenck P, DeBernardo RL, Yang CS, Bracker A, *et al.* Guidance for Clinicians on the Recognition and Management of Health Effects Related to Mold Exposure and Moisture Indoors. Center for Indoor Environments and Health, 2004.
- 9- Sehulster L, Chinn RY, Arduino MJ, Carpenter J, Donlan R, Ashford D, *et al.* Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Chicago IL; American Society for Healthcare Engineering/American Hospital Association; 2004.
- 10- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO - nº 9, de 16 de janeiro de 2003. Orientação Técnica elaborada por Grupo Técnico Assessor sobre Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo.
- 11 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 3.523/GM, de 28 de agosto de 1998.
- 12- Sidrim JJ, Paixão GC, Brilhante RS, Rocha MF. Principais fungos contaminantes em rotina de micologia médica. In: *Micologia Médica à luz de autores contemporâneos.* Sidrim JJ, Rocha MF. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004:318-326.
- 13- Vandewoude KH, Blot SI, Depuydt P, Benoit D, Temmerman W, Colardyn F, *et al.* Clinical relevance of *Aspergillus* isolation from respiratory tract samples in critically ill patients. *Crit Care.* 2006;10(1):R31.

- 14- Sidrim JJ, Cordeiro RA, Rocha MF. Aspergilose e Fusariose. In: Micologia Médica à luz de autores contemporâneos. Sidrim JJ, Rocha MF. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004:275-282.
- 15- Fungos e Actinomicetos Oportunistas, Anemófilos ou não. In: Guia para identificação de Interesse Médico – Fungos, Actinomicetos e Algas. Lacaz CS, Porto E, Heins-Vaccari EM, Melo NT. São Paulo: Sarvier, 1998:355-359.
- 16- Milan EP, Zaror L. Leveduras: Identificação Laboratorial. In: Micologia Médica à luz de autores contemporâneos. Sidrim JJ, Rocha MF. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004:89-101.
- 17- Tipos de esporas fúngicas. In: Calidad del aire. Aira MJ, Jato V, Iglesias I. Espanha: Xunta de Galicia;51-55.
- 18- Adhikari A, Sen MM, Gupta-Bhattacharya S, Chanda S. Volumetric assessment of airborne fungi in two sections of a rural indoor dairy cattle shed. *Environ Int.* 2004;29(8):1071-1078.
- 19- Brenier-Pinchart MP, Lebeau B, Quesada JL, Mallaret MR, Borel JL, Mollard A, *et al.* Influence of internal and outdoor factors on filamentous fungal flora in hematology wards. *Am J Infect Control.* 2009;37(8):631-637.
- 20- Panackal AA, Li H, Kontoyiannis DP, Mori M, Perego CA, Boeckh M, *et al.* Geoclimatic influences on invasive aspergillosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* 2010;50(12):1588-1597.
- 21- Nielsen, KF. Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genet Biol.* 2003;39:103–117.
- 22- Cooley JD, Wong WC, Jumper CA, Straus DC. Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome. *Occup Environ Med.* 1998;55(9):579-584.

- 23- Araujo R, Cabral JP, Rodrigues AG. Air filtration systems and restrictive access conditions improve indoor air quality in clinical units: *Penicillium* as a general indicator of hospital indoor fungal levels. *Am J Infect Control*. 2008;36(2):129-134.
- 24- Kasprzyk I. Aeromycology – main research fields of interest during the last 25 years. *Ann Agric Environ Med*. 2008;15(1):1-7.
- 25-Zoppas BCDA, Valencia-Barrera RM, Duso SMV, Fernández-González D. Fungal spores prevalent in the aerosol of the city of Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil, over a 2-year. *Aerobiologia*. 2006;22:119-126.
- 26- Mezzari A. Fungos Anemófilos em Porto Alegre – RS. 75f. Tese de Doutorado – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- 27- Panagopoulou P, Filioti J, Petrikkos G, Giakouppi P, Anatoliotaki M, Farmaki E, *et al*. Environmental surveillance of filamentous fungi in three tertiary care hospitals in Greece. *J Hosp Infect*. 2002;52(3):185-191.
- 28- Rocha, SM. 122f. Ocorrência de fungos em sistema de distribuição de água e sua correlação com isolados do ar em uma unidade pediátrica de transplante de células tronco hematopoiéticas. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.
- 29- Anaissie EJ, Stratton SL, Dignani MC, Lee CK, Summerbell RC, Rex JH, *et al*. Pathogenic molds (including *Aspergillus* species) in hospital water distribution systems: a 3-year prospective study and clinical implications for patients with hematologic malignancies. *Blood*. 2003;101(7):2542-2546.

- 30- Portnoy JM, Barnes CS, Kennedy K. Sampling for indoor fungi. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113(2):189-198.
- 31- ABNT NBR 16401. Instalações de ar condicionado – Sistemas Centrais e unitários. Parte 3: Qualidade do ar. Associação Brasileira de Normas Técnicas, 4 nov 2008. 28pg
- 32- ABNT NBR 7256. Tratamento do ar em estabelecimentos assistências de saúde (EAS) – Requisitos para projeto e execução das instalações. Associação Brasileira de Normas Técnicas, 29 abr 2005. 27pg.
- 33- Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Van Wijngaerden E. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Clin Infect Dis.* 2007;45(2):205-216.
- 34- Vonberg RP, Gastmeier P. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *J Hosp Infect.* 2006;63(3):246-254.
- 35- Falvey DG, Streifel AJ. Ten-year air sample analysis of *Aspergillus* prevalence in a university hospital. *J Hosp Infect.* 2007;67(1):35-41.
- 36- Curtis L, Cali S, Conroy L, Baker K, Ou CH, Hershov R, *et al.* *Aspergillus* surveillance project at a large tertiary-care hospital. *J Hosp Infect.* 2005;59(3):188-196.
- 37- Nihtinen A, Anttila VJ, Richardson M, Meri T, Volin L, Ruutu T. The utility of intensified environmental surveillance for pathogenic moulds in a stem cell transplantation ward during construction work to monitor the efficacy of HEPA filtration. *Bone Marrow Transplant.* 2007;40(5):457-460.
- 38- Trof RJ, Beishuizen A, Debets-Ossenkopp YJ, Girbes AR, Groeneveld AB. Management of invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic critically ill patients. *Intensive Care Med.* 2007;33(10):1694-1703.

- 39- Zilberberg MD, Shorr AF. Fungal infections in the ICU. *Infect Dis Clin North Am.* 2009;23(3):625-642.
- 40- Meersseman W, Lagrou K, Maertens J, Wilmer A, Hermans G, Vanderschueren S, *et al.* Galactomannan in bronchoalveolar lavage fluid: a tool for diagnosing aspergillosis in intensive care unit patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(1):27-34.
- 41- Reichenberger F, Habicht JM, Gratwohl A, Tamm M. Diagnosis and treatment of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. *Eur Respir J.* 2002;19(4):743-755.
- 42- Park SY, Kim SH, Choi SH, Sung H, Kim MN, Woo JH, *et al.* Clinical and radiological features of invasive pulmonary aspergillosis in transplant recipients and neutropenic patients. *Transpl Infect Dis.* 2010;12(4):309-315.
- 43- Morace G, Borghi E. Fungal infections in ICU patients: epidemiology and the role of diagnostics. *Minerva Anestesiol.* 2010;76(11):950-956.
- 44- Pereira AL, Bolzani FC, Stefani M, Charlin R. Uso sistêmico de corticosteróides: revisão da literatura. *Med Cutan Iber Lat Am.* 2007;35(1):35-50.
- 45- Ader F, Bienvenu AL, Rammaert B, Nseir S. Management of invasive aspergillosis in patients with COPD: rational use of voriconazole. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2009;4:279-287.
- 46- Cornillet A, Camus C, Nimubona S, Gandemer V, Tattevin P, Belleguic C, *et al.* Comparison of epidemiological, clinical, and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: a 6-year survey. *Clin Infect Dis.* 2006;43(5):577-584.
- 47- De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, *et al.* European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group; National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group

(EORTC/MSG) Consensus Group. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*. 2008;46(12):1813-1821.

48- Hao ZF, Ao JH, Hao F, Yang RY, Zhu H, Zhang J. Environment surveillance of filamentous fungi in two tertiary care hospitals in China. *Chin Med J (Engl)*.2011;124(13):1970-1975.

49- Kim KY, Kim YS, Kim D. Distribution characteristics of airborne bacteria and fungi in the general hospitals of Korea. *Ind Health*. 2010;48(2):236-243.

50- Cárdenas MX, Cortes JA, Parra CM. [*Aspergillus* spp in risk areas of transplant patients in a university hospital]. *Rev Iberoam Micol*. 2008;25(4):232-236.

51- Brunetti L, Santoro E, Cavallo P, Boccia G, Motta O, Capunzo M. Two-years surveillance of fungal contamination in three hospital departments in Campania region. *J Prev Med Hyg*. 2006 Mar;47(1):22-25.

52- Panagopoulou P, Filioti J, Farmaki E, Maloukou A, Roilides E. Filamentous fungi in a tertiary care hospital: environmental surveillance and susceptibility to antifungal drugs. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007;28(1):60-67.

53- Mahieu LM, De Dooy JJ, Van Laer FA, Jansens H, Ieven MM. A prospective study on factors influencing *Aspergillus* spore load in the air during renovation works in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2000;45(3):191-197.

54- Kistemann T, Hüneburg H, Exner M, Vacata V, Engelhart S. Role of increased environmental *Aspergillus* exposure for patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) treated with corticosteroids in an intensive care unit. *Int J Hyg Environ Health*. 2002;204(5-6):347-351.

- 55- Tang CS, Chung FF, Lin MC, Wan GH. Impact of patient visiting activities on indoor climate in a medical intensive care unit: a 1-year longitudinal study. *Am J Infect Control*. 2009;37(3):183-188.
- 56- Gaio A, Teixeira M, Fuentefria A. Incidência de fungos anemófilos do gênero *Aspergillus* presentes no ar durante o período de reforma em ambiente hospitalar. *RBAC*. 2011;43(1):42-45.
- 57- Cordeiro RA, Brilhante RS, Pantoja LD, Moreira Filho RE, Vieira PR, Rocha MF, *et al.* Isolation of pathogenic yeasts in the air from hospital environments in the city of Fortaleza, northeast Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2010;14(1):30-34.
- 58- Melo LL, Lima AM, Damasceno CA, Vieira AL. Flora fúngica no ambiente da Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica e Neonatal em hospital terciário. *Rev. paul. pediatr*. 2009;27(3):303-308.
- 59- Catão RM, Lima EO, Vieira KU, Gomes LF, Ceballos BS. Distribuição da microbiota anemófila em ambiente hospitalar (Campina Grande, PB). *RBAC*. 1998;30:25-30.
- 60- Lobato RC, Vargas VS, Silveira ES. Sazonalidade e prevalência de fungos anemófilos em ambiente hospitalar no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Fac. Ciênc. Méd. Sorocaba*. 2009;11(2):21-28.
- 61- Quadros ME, Lisboa HM, Oliveira VL, Schirmer WN. Qualidade do ar em ambientes internos hospitalares: estudo de caso e análise crítica dos padrões atuais. *Eng Sanit Ambient*. 2009;14(3):431-438.

JUSTIFICATIVA

São escassos os estudos nacionais que avaliem a presença de fungos potencialmente patogênicos no ar de unidades de terapia intensiva. Este é um tema de relevância médica, uma vez que a presença de fungos patogênicos pode elevar o risco de doença fúngica invasiva em indivíduos criticamente enfermos, bem como em imunossuprimidos por causas diversas. Em particular, poucos são os estudos na literatura que tenham buscado associar a quantidade de fungos presentes no ar de UTIs com a incidência de doença fúngica invasiva nos pacientes admitidos nestas unidades.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar o ar de duas UTIs do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre e uma UTI do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, quanto à presença de fungos.

Específicos

Identificar os fungos isolados do ar das unidades investigadas, quantificando os achados em termos de UFC/m³.

Avaliar a influência de fatores ambientais como temperatura, umidade, condições climáticas e variação sazonal na concentração de fungos no ar das UTIs.

Correlacionar os resultados ambientais com os resultados encontrados em amostras clínicas.

APROVAÇÃO NOS COMITÊS DE ÉTICA

O presente trabalho obteve aprovação nos comitês de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (projeto n° 09 – 339) e Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia (projeto n° 3044/09).

ARTIGO 1

submetido para *Journal Hospital Infection*

The environment as a potential determinant of the frequency of invasive aspergillosis in the intensive care

C. Boff,^a B.C.D.A. Zoppas,^b V.R. Aquino,^{a,c} N.M. Kuplich,^c D. Miron,^b A.C. Pasqualotto^{a,d,e*}

^aUniversidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; ^bUniversidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brazil; ^cHospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil; ^dSanta Casa Complexo Hospitalar, Porto Alegre, Brazil; ^eUniversidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

*Corresponding author: Alessandro C. Pasqualotto, Molecular Biology Laboratory, Santa Casa de Porto Alegre. Av Independência 155, Hospital Dom Vicente Scherer, heliport, 90035-075, Porto Alegre, Brazil. Phone: +55 51 99951614; Fax: +55 51 32137491; e-mail: pasqualotto@ufcspa.edu.br

Summary

Background: invasive aspergillosis (IA) seems to be an emerging condition in intensive care units (ICUs). However, few attention has been given to the role of environmental factors that could increase the risk for IA in the ICU.

Aim: to determine the concentration of airborne fungi in three Brazilian ICUs, in an attempt to correlate fungal burden with the frequency of *Aspergillus* spp isolation from clinical samples in patients admitted to these units.

Methods: during a 1-year period we quantitatively evaluated the presence of fungi in the air of three ICUs in Porto Alegre, Southern Brazil. Air sampling was performed using a six-stage Andersen[®] sampler. The quantity of fungi was correlated with environmental factors such as temperature, relative air humidity and weather climatic conditions.

Findings: *Penicillium* spp were the most common fungi in the indoor ICU air, followed by *Cladosporium* spp and *Aspergillus* spp. Higher fungal concentrations were associated with increments in temperatures and humidity, as well as the presence of rains and autumn season. Only one of the ICUs studied showed equal concentrations of *Aspergillus* conidia in the indoor air, in comparison to the outdoor environment. All cases of *Aspergillus* colonization and IA cases observed during the study occurred in that particular ICU.

Conclusion: this study suggests that the environment may be one of the determinants of the occurrence of IA in ICU patients.

Key Words: Invasive aspergillosis, Six-stage Andersen[®] sampler, *Aspergillus* spp, COPD.

INTRODUCTION

Invasive aspergillosis (IA) has been increasingly recognised in non-neutropenic patients in the intensive care unit (ICU). Patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) are apparently at a high risk to develop the disease, particularly in the context of therapy with corticosteroids.^{1,2} Since the clinical presentation of IA may be non-specific in this setting, diagnosis is usually late. In fact, it has been argued that IA may be one of the most frequently missed conditions in critical ill patients.¹ Even though IA has emerged in the ICU, the incidence of IA in these units has varied largely in the literature, from 0.3% to up to 31%.¹⁻⁸ Among the several studies examining frequency of IA in critically ill patients, few attention has been given to the role of environmental factors, especially the concentration of fungi in the air of these units. In this study, we evaluate quantitatively the presence of airborne fungi in three Brazilian ICUs. The survey was conducted in parallel to a cohort study that aimed to determine the incidence of IA in patients with COPD admitted to these ICUs.

METHODS

Participating Institutions

The study was performed in three adult ICUs located in two university hospitals in Porto Alegre, Southern Brazil. ICU 1 has 12 beds and a total area of 340 m². Only patients with lung disorders are admitted to ICU 1. ICUs 2 and 3 are general ICUs with 38 beds (700 m²) and 34 beds (590 m²), respectively. The study was carried out from Feb 2010 to Jan 2011.

Air Sampling and Mycological Methods

Air samples were collected monthly from 5-6 indoor points in each participating ICUs. Sampling locations included an isolation room and other regularly distributed points in the ICU. In every unit, one external measurement was also taken. This external point was located inside the hospital and had natural ventilation (open windows). The following variables were evaluated, at the moment of each air sampling: room temperature, relative humidity of air, and external climatic conditions (i.e., rainy, cloudy or sunny weather).

Air was sampled during 20 min using a six-stage Andersen[®] sampler at a constant rate of 28.3 L/min. The equipment was placed at 1.5 m from the ground. Culture media used in the study was Sabouraud Agar with chloramphenicol. Petri dishes were incubated at 25°C for up to 7 days and observed daily for fungal growth. Fungal genera were identified at the genus/species level according to their macroscopic and microscopic morphological characteristic. Quantitative results were provided in terms of number of colony forming units (CFU) per m³ of air. Fungal concentration in the indoor and outdoor air were compared and ratios ≥ 1.0 were considered as evidence of excess of fungi in the indoor ICU air.

Aspergillus isolation from Clinical Samples

During the period of the study, all isolates of *Aspergillus* spp obtained from clinical samples in the participating ICUs were registered. The distinction between *Aspergillus* colonization and IA was performed based on the EORTC/MSG criteria.⁹

Statistical Analyses

Descriptive statistics were used to summarize the data. The descriptive and inference analyses (Kruskal-Wallis Test and Spearman coefficient) were conducted with Prism 5 software

(GraphPad Prism Software Inc, San Diego, USA). For all comparisons, p values of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Distribution of Fungi in the Indoor and Outdoor Environments of the ICUs

During 12 months, 185 indoor and 36 outdoor samplings were performed in the three ICUs, totalizing 1326 culture plates. Table I shows the main fungal genera detected in the study. More than half of the isolates corresponded to either *Cladosporium* spp or *Penicillium* spp, with a predominance of *Cladosporium* spp in the outdoor environment and *Penicillium* spp in the indoor air. Fungi belonging to the genus *Aspergillus* represented <10% of the overall fungi recovered from the indoor air, and 15% of the isolates found in the outdoor environment.

Impact of Temperature, Humidity and Climatic Conditions

The indoor temperature in the ICUs ranged between 19.3-27.2°C (median 23.7°C). A positive correlation was found between temperature and the amount of fungal conidia in the indoor air ($r=0.22$, $p=0.003$). Relative humidity of indoor air in the ICUs ranged between 31-64% (median 51%) and a significant correlation was observed between this humidity and indoor fungal concentrations ($r=0.332$, $p<0.001$). In the outdoor environment, neither temperature nor humidity correlated with fungal concentrations.

A rainy weather was associated with the amount of *Aspergillus* section *Fumigati* in the indoor air. Median concentration for these fungi were 25.6 CFU/m³ and 0.0 CFU/m³ in the presence of rain, in comparison to a sunny/cloudy day ($p=0.003$). This association was however

observed only for ICU 1, there was no rain at the moment that air was sampled in the other ICUs, along the year of study.

Seasonal Variations of Fungal Air Concentrations

Figure 1 shows the seasonal distribution of fungi in the indoor environments of the three ICUs. For ICUs 1 and 2 a significantly higher concentration of fungi was observed in the autumn months, in comparison to summer and spring ($p < 0.001$ and $p = 0.004$, respectively). The same seasonal trend was observed in ICU 3 ($p = 0.083$).

Comparing the Quality of Air in the three ICUs

When the indoor air of the three ICUs was compared, a lower fungal burden was observed in ICU 3 ($p < 0.001$). Median overall fungal concentration for ICU 1, 2 and 3 were 109.5, 134.3 and 55.7 CFU/m³, respectively.

Concentrations of Aspergillus species in the Air of the three ICUs

As shown in Table II, only ICU 3 showed a significantly lower concentration of *Aspergillus* spp in the indoor environment in comparison to the outdoor air ($p = 0.039$). On the contrary, indoor air in the ICU 1 showed similar *Aspergillus* spp concentrations, in comparison to the outdoor air (indoor/outdoor factor=1). When the three ICUs were compared, ICU 1 had a significantly higher concentration of *Aspergillus* spp conidia in the indoor air, in comparison to ICU 3 ($p = 0.032$).

Recovery of Aspergillus species from Clinical Samples

Aspergillus spp were recovered from seven patients during the period of study – including four cases of *Aspergillus* colonization and three cases of probable IA. These isolates belonged to *Aspergillus* section *Fumigati* (n=6) and *Aspergillus* section *Nigri* (n=1). All isolates were obtained from patients admitted in ICU 1.

DISCUSSION

Even though the environment plays an important role in the development of IA, a correlation between the concentration of conidia and the subsequent risk of disease has never been clearly demonstrated. For example, during IA outbreaks the concentrations of *Aspergillus* species has varied from zero to >100 CFU/m³.¹⁰ It seems logical and perhaps desirable to reduce to zero the amount of airborne fungi in areas in which severely neutropenic patients are being taking care of. However, such low fungal loads are probably not realistic in hospital areas that are not fully equipped with high efficiency particulate air (HEPA) filters – like most of the ICUs in place around the globe. In the absence of clearly defined cut-offs for fungal concentrations in the air in these areas, an interesting strategy would consist of a comparison of the quantity of fungi presented in the indoor and the outdoor environments of these units.¹¹ In this approach, a “healthy” indoor environment would be the one that contains the same fungal elements presented in the outdoor air, but in smaller quantities.

In this study, only one out of three ICUs evaluated (ICU 1) showed concentrations of *Aspergillus* conidia in the indoor air that equalled the amount of conidia presented in the external environment. The indoor air of ICU 1 showed a significantly higher quantity of *Aspergillus* spp conidia, in comparison to the other ICUs. It is interesting to note that the isolation of *Aspergillus*

spp from clinical samples occurred only in ICU 1. These findings could suggest that patients admitted in ICU 1 had a higher risk of being environmentally exposed to *Aspergillus* species, with the potential to developing IA. However, we cannot conclusively assume that these patients primarily acquired the infection in the ICU, for several reasons. First of all, ICU 1 is specialized in the care of patients with pulmonary diseases, a population at high risk for *Aspergillus* colonization. Many of these patients were in ICU 1 for very short periods (median length of stay 6 days before *Aspergillus* spp was recovered from a clinical sample; range 2-14 days). Therefore, *Aspergillus* spp colonization may have occurred before admission to the ICU. Since molecular typing of the clinical and environmental isolates of *Aspergillus* spp was not made, the source of infections remains unclear.

During the conduction of this survey, a prospective cohort study was ongoing to determine the incidence of IA in ventilated COPD taking corticosteroids and demonstrating a new lung infiltrate.¹² In addition to microscopy and culture, patients were also studied by serum IgE, *Aspergillus* precipitins, serum and respiratory galactomannan levels, and *Aspergillus* DNA detection in respiratory samples by real time polymerase chain reaction (PCR). Of the 47 evaluated patients, only two were culture-positive for *Aspergillus* spp and therefore diagnosed with probable IA (4.2%). Curiously, these two patients had been admitted to ICU 1. Since all patients in the study were diagnosed with COPD, the fact that ICU 1 is specialized in pulmonary diseases cannot be the only explanation for the lack of IA cases in ICUs 2 and 3. Conversely, the frequency of IA found in this study was relatively low (4.2%), in comparison to other studies previously published in the literature.^{5,8} However, it is also important to emphasize that the fungi belonging to the genus *Aspergillus* represented only 7.4% of the overall fungal population recovered from ICU 1 (median of 3.5 CFU/m³). Since previous studies evaluating the incidence

of IA in the ICU did not report the amount of *Aspergillus* spp presented in the air, it is hard to conclude on any possible association between fungal counts in the indoor ICU air and the incidence of IA in the ICU. Based on our study, a low frequency of IA in the ICU may be associated with low concentration of *Aspergillus* conidia in ICU. Certainly, host factors play a major role in the incidence of IA but that is not the scope of this study.

When the three ICUs participating in this study were compared, ICU 3 showed the lowest fungal concentration in the indoor air. In this sense, it is important to mention that ICU 3 is equipped with G3 filters (retention efficiency of 80-90% for particles $>5 \mu\text{m}$)¹³ whilst ICUs 1 and 2 are equipped with G1 filters (50-65% efficiency). ICU 3 has a central air conditioner which is periodically cleaned and maintained by a specialized company that uses antifungals in the system. In comparison, ICUs 1 and 2 have wall air conditioners that are taken care by the institution itself.

Climatic conditions also influenced the concentration of fungi in the studied ICUs. A marked variation in fungal counts occurred between seasons, with autumn months having the highest prevalence of fungi in the indoor ICU environment. A previous Brazilian study conducted in a transplant unit in Sao Paulo also observed higher quantities of fungi in the autumn months,¹⁴ a finding that has also been described in other countries.^{15,16,17} In the present study, a weak but significant correlation was also found between temperature, humidity with the total concentration of fungi in the indoor environment of the ICUs. The association between the occurrence of rains and a higher fungal concentration in the air was also shown by others.^{15,18} However, a recent study conducted in two transplant centres in the United States¹⁹ revealed that the occurrence of low precipitations and high temperatures was associated to a higher concentration of conidia in Seattle, but not in Houston. Collectively, these data demonstrate the

complexity of the diverse factors that are capable to interfere with the environmental concentration of fungi, making extremely difficult to generalize the results of any particular study.

Some additional limitations of this study should to be mentioned. For logistic reasons, it was not possible to obtain samples from the outdoor hospital air – that would have provided us with more accurate data on the distribution of fungi in the environment. Since all plates were incubated at 25°C, the actual frequency of *Aspergillus* section *Fumigati* – a thermotolerant fungus²⁰ – may have been underestimated. Finally, it was not possible to collect environmental samples on the same days in all three ICUs, hampering the analyses of the influence of environmental factors in the distribution of fungal isolates in the participating ICUs.

In conclusion, we observed a marked variation in the distribution of fungi in the indoor air of three Brazilian ICUs, a fact that could be related to the type of filter installed in each of these units. The reason for a higher concentration of *Aspergillus* spp in the indoor air of one of the evaluated ICUs (ICU 1) is uncertain. Regardless of the reason, all clinical isolates of *Aspergillus* spp were recovered from ICU 1, suggesting that the environment may play a role in the incidence of *Aspergillus* colonization and IA in critically ill patients. The association between fungal concentrations in the indoor ICU air and the frequency of IA in such units deserve further investigation.

REFERENCES

- 1- W. Meersseman, K. Lagrou, J. Maertens, E.V. Wijngaerden. Invasive aspergillosis in the intensive care unit. *Clin Infect Dis* 2007; **45**:205-216.
- 2- J. Guinea, M. Torres-Narbona, P. Gijón *et al.* Pulmonary aspergillosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease: incidence, risk factors, and outcome. *Clin Microbiol Infect* 2010; **16**:810-877.
- 3- K.H. Vandewoude, S.I. Blot, P. Depuydt *et al.* Clinical relevance of *Aspergillus* isolation from respiratory tract samples in critically ill patients. *Critical Care* 2006; **10**(1):R31.
- 4- W. Meersseman, S.J. Vandecasteele, A. Wilmer, E. Verbeken, W.E. Peetermans, E.V. Wijngaerden. Invasive Aspergillosis in critically ill patients without malignancy. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; **170**:621-625.
- 5- J. Vallés, E. Mesalles, D. Mariscal *et al.* A 7-year study of severe hospital-acquired pneumonia requiring ICU admission. *Intensive Care Med* 2003; **29**:1981-1988.
- 6- J. Garnacho-Montero, R. Amaya-Villar, C. Ortiz-Leyba *et al.* Isolation of *Aspergillus* spp. from the respiratory tract in critically ill patients: risk factors, clinical presentation and outcome. *Critical care* 2005; **9**:R191-R199.
- 7- A. Cornillet, C. Camus, S. Nimubona *et al.* Comparison of Epidemiological, Clinical, and Biological Features of Invasive Aspergillosis in Neutropenic and Nonneutropenic Patients: A 6-Year Sursey. *Clin Infect Dis* 2006; **43**:577-584.
- 8- W. Meersseman, K. Lagrou, J. Maertens *et al.* Galactomannan in Bronchoalveolar Lavage Fluid. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; **177**: 27-34.
- 9- B. De Pauw, T.J. Walsh, J.P. Donnelly *et al.* Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal

Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis* 2008;**46**:1813-1821.

10- R.P. Vonberg, P. Gastmeier. Nosocomial aspergillosis in outbreak settings. *J Hosp Infect* 2006;**63**:246-254.

11- E. Storey, K.H. Dangman, P. Schenck *et al.* Guidance for Clinicians on the Recognition and Management of Health Effects Related to Mold Exposure and Moisture Indoors. University of Connecticut Health Center, 2004.

12 - V.R. Aquino, F. Nagel, H.F. Andreolla *et al.* The Performance of Real-Time PCR, Galactomannan, and Fungal Culture in the Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Ventilated Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Mycopathologia* 2012. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22382738.

13- BS EN 779:2002. Particulate air filters for general ventilation. Determination of the filtration performance. British-Adopted European Standard, 5 dez 2002, 74 pg.

14- S.M. Rocha. Ocorrência de fungos em sistema de distribuição de água e sua correlação com isolados do ar em uma unidade pediátrica de transplantes de células tronco hematopoiéticas. Orientador: Arnaldo Lopes Colombo. São Paulo: USP, 2009, 122pg. Dissertação. (Mestrado em Ciências).

15- M.P. Brenier-Pinchart, B. Lebeau, J.L. Quesada *et al.* Influence of internal and outdoor factors on filamentous fungal flora in hematology wards. *Am J Infect Control* 2009;**37**:631-637.

16- P. Panagopoulou, J. Filioti, G. Petrikosy *et al.* Environmental surveillance of filamentous fungi in three tertiary care hospitals in Greece. *J Hosp Infect* 2002;**52**:185-191.

17- M. Sautour, N. Sixt, F. Dalle *et al.* Profiles and seasonal distribution of airborne fungi in indoor and outdoor environments at a French hospital. *Sci Total Environ* 2009;**407**:3766–3771.

- 18- R. Tormo Molina, M.A. Gonzalo Garijo, A.F. Muñoz Rodríguez, I. Silva Palacios. Pollen and spores in the air of a hospital out-patient ward. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2002;**30**:232-238.
- 19- A.A. Panackal, H. Li, D. Kontoyiannis *et al.* Geoclimatic influences on Invasive Aspergillosis after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clin Infect Dis* 2010;**50**:1588-1597.
- 20- Guarro J, Xavier MO, Severo LC. Differences and Similarities Amongst Pathogenic Aspergillus Species. In: Pasqualotto AC, Ed. *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention*, 1st edn. Dordrecht: Springer 2010; 7-32.

Table I Distribution of Fungal Genera in the air of three intensive care units (ICU) in Porto Alegre, Brazil, during a year. There was marked predominance of fungi of the genera *Penicillium* and *Cladosporium*, particularly in indoor and outdoor environments of ICUs, respectively.

Genera	ICU 1		ICU 2		ICU 3	
	Ind (%)	Out (%)	Ind (%)	Out (%)	Ind (%)	Out (%)
<i>Cladosporium</i> spp	23.9	46.3	39.8	66.1	16.7	36.6
<i>Penicillium</i> spp	45.0	20.7	18.6	11.7	44.8	14.4
<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>	6.0	3.4	0.5	0.4	3.0	1.5
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	0.2	0.4	0.4	0.7	0.7	13.6
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>	0.1	0.3	0.1	0.1	0.2	0.0
Other species of <i>Aspergillus</i>	1.1	1.0	2.0	0.5	1.1	0.6
<i>Fusarium</i> sp	0.1	0.6	0.4	0.4	0.8	0.3
<i>Rhizopus</i> spp	0.1	0.3	0.2	0.4	0.2	0.2
Yeasts*	2.8	1.7	9.9	1.5	6.5	3.6
Other airborne fungus**	20.7	25.3	28.1	18.2	26.0	29.2

ICU, intensive care unit; Ind, indoor; Out, outdoor.

* Including *Candida* spp and *Rhodotorula* spp

** Including *Curvularia* spp, *Alternaria* spp, *Trichoderma* spp, *Acremonium* spp e sterile filamentous fungi.

Table II Concentration of *Aspergillus* spp in three ICUs. The ICU 1 there was a similar concentration of *Aspergillus* spp in indoor and outdoor environments. The ICU 3 showed significantly lower concentrations in the indoor environments.

		Factor				
		Samples (n)	Median*	Range*	(ICU/Outdoor)**	p values
ICU 1	Indoor	57	3.5	0.0 – 235.0		
	Outdoor	12	3.5	0.0 – 95.4	1.00	0.638
ICU 2	Indoor	60	1.8	0.0 – 76.0		
	Outdoor	12	5.3	0.0 – 15.9	0.34	0.369
ICU 3	Indoor	68	1.8	0.0 – 58.3		
	Outdoor	12	3.5	0.0 – 288.0	0.51	0.039

* CFU/m³

** Factor calculated with the median

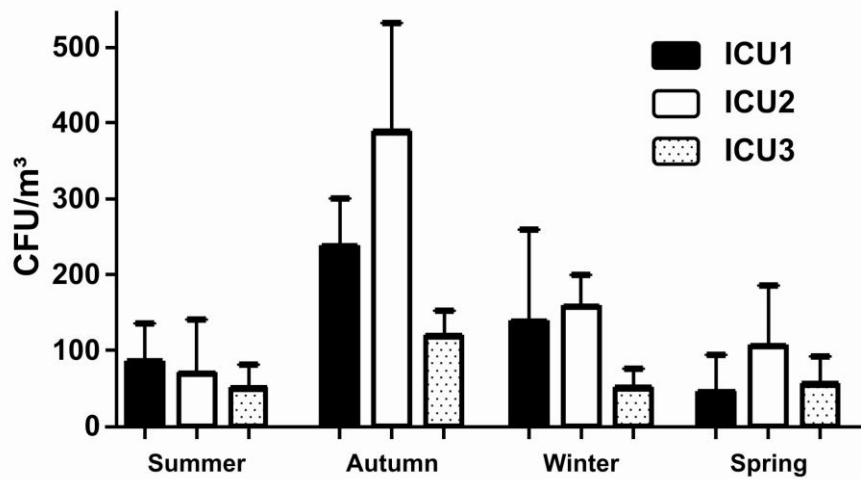


Figure 1 Seasonal variation on fungal concentration in three intensive care units in Brazil.

The highest fungal counts were observed during autumn months.

ARTIGO 2

American Journal of Infection Control

(no prelo)

Technical note: the effect of different incubation temperatures on the recovery of *Aspergillus* species from hospital air

Cristiane Boff, Pharm,^a Caroline P. Brun, MD,^{a,b} Diogo Miron, Pharm, MSc,^c Barbara C. D. A.

Zoppas, PharmD,^c Alessandro C. Pasqualotto, MD, PhD^{a,b,d}

From the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;^a Santa Casa Complexo Hospitalar, Porto Alegre, Brazil;^b Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brazil;^c Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.^d

Address correspondence to Alessandro C. Pasqualotto, MD, PhD. Molecular Biology Laboratory. Santa Casa Complexo Hospitalar, Hospital Dom Vicente Scherer, 8 andar, Av Independencia 155, Porto Alegre, 90035-075, Brazil Phone: +55 51 99951614; Fax: +55 51 32137491. E-mail: pasqualotto@santacasa.tche.br

Conflicts of Interest: None to report.

ABSTRACT

Environmental air monitoring is a common practice in many institutions. However, the methodology involved in these studies has not been standardized, with most centers using incubation at room temperature. Here we demonstrate that incubating plates at higher temperatures (35-40°C) facilitates growth of *Aspergillus* section *Fumigati*, the most important pathogenic mold to humans. The implications for these findings are discussed.

INTRODUCTION

Invasive aspergillosis (IA) is a major threat to the immunocompromised host. Due to the ubiquity of *Aspergillus* species in the environment, the hospital air may also be a source from which patients can inhale *Aspergillus* conidia. In order to reduce the amount of fungal particles in the hospital, many institutions monitor air quality in critical areas such as transplant, surgical and intensive care units. However, the laboratory technique employed to recover fungi from the air is not properly standardized – therefore, discrepant results may be obtained among studies. Here we compared the effect of different incubation temperatures on the recovery of potentially pathogenic fungi – particularly *Aspergillus* species – in the hospital environment.

METHODS

The study was conducted in two large Brazilian hospitals during a 5-month period (Sept 2010-Jan 2011). Air samples were obtained monthly using N-6 Andersen[®] sampler in intensive care as well as in hematopoietic stem cell transplant units. All samples were performed in duplicate. Plates containing Sabouraud Agar with chloramphenicol were simultaneously incubated at 25°C and 35-40°C. Fungal growth was observed daily for up to 7 days and fungal

identification at the genus/species level was performed by classical mycology methods. Quantitative results were obtained by dividing the total number of fungal colonies (CFU) on the Petri dishes by the volume of air (m^3). For the purposes of this study, all yeasts as well as molds belonging to the genus *Aspergillus*, *Fusarium*, and the Zygomycetes were considered potentially pathogenic fungi. Environmental fungi included species of *Cladosporium*, *Penicillium*, and *Trichoderma*, as well as dematiaceous fungi and sterile filamentous fungi.

Descriptive statistics was used to summarize the data. Dependent variables were treated with Wilcoxon test. Samples revealing no fungal growth were excluded from the analysis. For all comparisons, p values of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

During the period of study, 40 paired observations were performed. At higher incubation temperatures (35-40°C), the rate of growth of environmental fungi was lower than at 25°C (n=32 pairs; median of 11.5 vs. 144.9 CFU/ m^3 , respectively, $p < 0.001$). Similar results were observed for yeasts (n=22 pairs; median of 0.0 vs. 3.5 CFU/ m^3 , $p < 0.001$), *Rhizopus* spp (n=10 pairs; median of 0.9 vs. 1.8 CFU/ m^3 , $p = 0.045$), *Aspergillus* section *Nigri* (n=15 pairs; median of 1.8 vs. 1.8 CFU/ m^3 , $p = 0.030$) and *Fusarium* spp (n=9 pairs; median of 0.0 vs. 8.8 CFU/ m^3).

The growth of *Aspergillus* section *Fumigati* was more pronounced at higher incubation temperatures than at 25°C (n=21 pairs; median of 5.3 vs. 1.8 CFU/ m^3 , $p = 0.031$). The same effect however was not observed for any of the other *Aspergillus* species studied. For instance, growth of all *Aspergillus* species ($p = 0.351$) and growth of *Aspergillus* section *Flavi* ($p = 0.435$) were not influenced by changes in incubation temperature. Figure 1 shows the main results of this study.

DISCUSSION

This study clearly demonstrates that the incubation of plates at 35-40°C favors the growth of *Aspergillus* section *Fumigati*, in comparison to incubation at 25°C. On the other hand, the growth of environmental fungi, yeasts, *Rhizopus* spp, *Aspergillus* section *Nigri* and *Fusarium* spp was reduced at higher temperatures. These findings are not entirely surprising when one considers the known thermotolerance of *A. fumigatus*.¹ Using higher incubation temperatures may therefore create a less competitive scenario for *A. fumigatus*, in comparison to faster-growing fungi that are less able to tolerate such high temperatures.

The results of this study may potentially have an impact on how environmental studies are conducted in hospitals. For instance, different incubation temperatures have been used in studies that monitored indoor air in hospitals. In most of these studies a single incubation temperature was used, usually 25°C. In these studies, there was a predominance of fungi belonging to the genera *Penicillium* and *Cladosporium*,^{2,3} with a low frequency of *Aspergillus* species.²⁻⁵ In some others, the incubation temperature is not even mentioned.⁶ The use of different incubation temperatures have already been investigated in a study from Italy.⁷ At 25°C, *Cladosporium* spp was the most frequently isolated fungus (60.4%), followed by *Penicillium* spp (19.2%), *Alternaria* spp and other dematiaceous fungi (2.8%). *Aspergillus* spp accounted for just 2.3% of fungal colonies incubated at 25°C. Incubating plates at 37°C resulted in a marked reduction (17-25-fold) of environmental fungi, even though the frequency of *Aspergillus* spp. recovery at 37°C was increased to 34%.

Although environmental monitoring is a common practice in many hospitals, it is surprising to see that so far there is no standard technique for the detection of airborne fungi in these settings. Based on our findings, we conclude that studies that utilize incubation of plates at

25°C could potentially underestimate the presence of *Aspergillus* section *Fumigati*, currently the most important filamentous fungus in medical mycology. Studies aiming to evaluate the frequency of *Aspergillus* section *Fumigati* in the air should therefore always include incubation of plates at temperatures of 35°C or higher, combined or not with incubation at 25°C.

REFERENCES

1. Ben-Ami R, Kontoyiannis DP. Pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis. In: Pasqualotto AC, ed. *Aspergillosis: from diagnosis to prevention*. Dordrecht: Springer, 2010. p. 345-79.
2. Perdelli F, Cristina ML, Sartini M, Spagnolo AM, Dallera M, Ottria G, *et al.* Fungal Contamination in hospital environments. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006;27:44-7.
3. Kim KY, Kim YS, Kim D. Distribution characteristics of airborne bacteria and fungi in the general hospital of Korea. *Ind Health* 2010;48:236-43.
4. Cárdenas MX, Cortes JA, Parra CM. [*Aspergillus* spp. in risk areas of transplant patients in a university hospital]. *Rev Iberoam Micol* 2008;25:232-6.
5. Sautour M, Sixt N, Dalle F, L'ollivier C, Calinon C, Fourquenot V, *et al.* Prospective survey of indoor fungal contamination in hospital during a period of building construction. *J Hosp Infect* 2007;67:367-73.
6. Lee LD, Hachem RY, Berkheiser M, Hackett B, Jiang Y, Raad II. Hospital environment and invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancy. *Am J Infect Control* 2011 (in press).
7. Pini G, Faggi E, Donato R, Sacco C, Fanci R. Invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients and the influence of hospital renovation. *Mycoses* 2007;51:117-22.

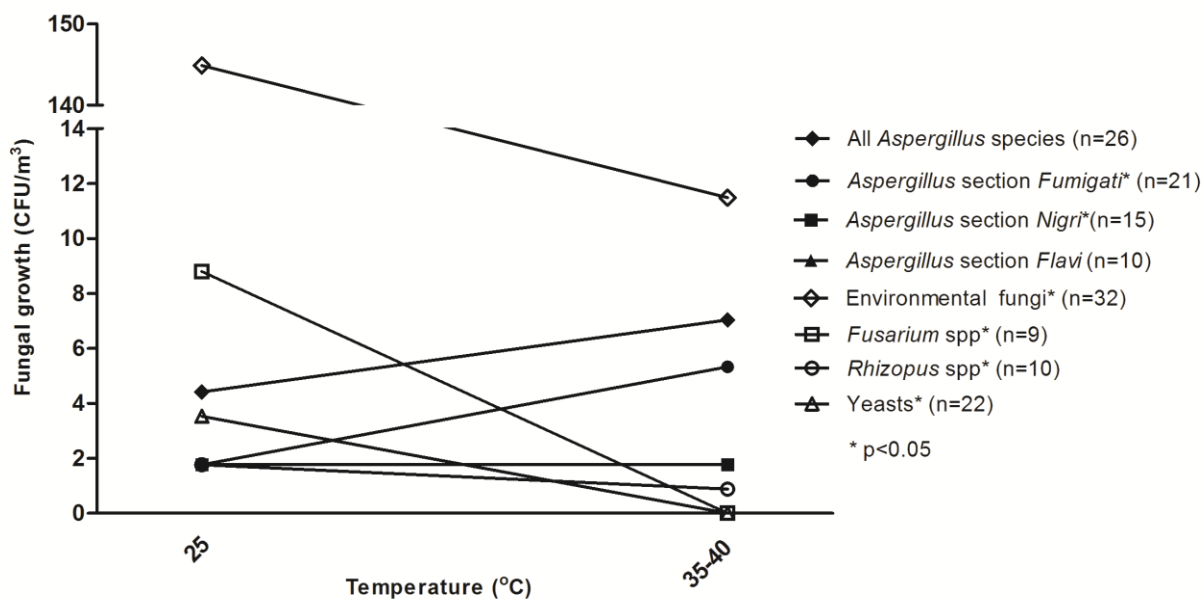


Figure 1. Fungal growth at different incubation temperatures. Higher temperatures stimulated the recovery of *Aspergillus* section *Fumigati*. The reported values designate the median results in terms of colony formed units (CFU) per m³

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em hospitais, surtos de aspergilose invasiva têm sido relacionados com um aumento na concentração de conídios no ar, principalmente em locais que abrigam pacientes suscetíveis, como unidades de transplante e de terapia intensiva. Frente a esta problemática, o monitoramento do ar interno pode auxiliar na identificação de possíveis fontes dispersoras de conídios, como também pode ser utilizada para avaliar, de forma rotineira, a qualidade do ar nos ambientes, a fim de buscar medidas para melhorar a qualidade do ar.

São escassos, em nosso meio, estudos sobre a presença de fungos patogênicos no ar de unidades de terapia intensiva. Este é um tema de relevância médica, uma vez que a presença de fungos patogênicos pode elevar o risco de doença pulmonar invasiva em indivíduos imunossuprimidos por corticoterapia ou outras terapias, apesar de ainda ser desconhecida a concentração de conídios no ar necessária para causar aspergilose invasiva nos pacientes. Além disto, os órgãos governamentais não estabeleceram níveis aceitáveis de concentração de conídios em ambientes hospitalares sem uso de filtros HEPA, provavelmente porque a concentração de conídios é influenciada por vários fatores, desde as características físicas dos mesmos até variações climáticas, sazonais e atividades como construções e reformas.

Em nosso estudo, buscamos avaliar a qualidade do ar de três UTI em hospitais da cidade de Porto Alegre e observamos a presença de sazonalidade dos fungos nas três UTIs, com maior concentração de propágulos nos meses de outono. Como também, a UTI que apresentou casos de aspergilose invasiva foi a mesma onde encontramos maiores concentrações de *Aspergillus* spp no ar, quando comparado com o ambiente externo e quando comparado entre as três UTIs. E, a UTI com filtros de ar de maior eficiência que as demais mostrou significativa redução de conídios no ambiente interno.

No estudo demonstramos ainda uma maior recuperação de *Aspergillus* seção *Fumigati* quando a temperatura de incubação foi elevada de 25°C à 35-40°C, indicando que 35-40°C deve ser considerada como temperatura ideal de incubação para estudos subsequentes cujo enfoque seja o isolamento e quantificação deste fungo.