

Comparação dos métodos gravitacional e de impactação para análise microbiológica da qualidade do ar de interiores

Rafael Agnischock Ribeiro^{1*}, Sueli Teresinha Van Der Sand²

Título resumido: Comparação de dois métodos de análise microbiológica do ar

1. Aluno de bacharelado do curso de Ciências Biológicas, Departamento de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Campus do Vale, Bloco IV - Prédio 43433, CEP 91501-970, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
2. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Rua Sarmento Leite, 500, sala 150, CEP 900500-170, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

*Autor para contato. E-mail: rafael_agnischock@hotmail.com

RESUMO: (Comparação dos métodos gravitacional e de impactação para análise microbiológica da qualidade do ar de interiores)

A poluição microbiana é um elemento-chave da poluição do ar em ambientes fechados e é causada por centenas de espécies de bactérias e fungos. Dois dos métodos mais largamente utilizados de amostragem de ar são aqui comparados: sedimentação espontânea e impactação em meio sólido com amostrador de Andersen de um estágio. Para isso foram realizadas três coletas em três ambientes com diferentes características em uma universidade de Porto Alegre, Brasil: um auditório com capacidade de 1164 pessoas; uma sala cirúrgica e uma sala de recuperação e indução anestésica de um centro cirúrgico de animais de pequeno porte. No auditório o coeficiente de correlação foi alto ($r = 0,775$) e o coeficiente de variação foi menor nas amostragens passivas ($CV = 25,93$). Já nas amostragens do centro cirúrgico, os coeficientes de correlação foram negativos e os coeficientes de variação foram menores nos métodos ativos. Em todos ambientes foram identificados gêneros de fungos oportunistas como *Penicillium* spp, *Aspergillus* spp, *Cladosporium* spp, entre outros.

Palavras-chave: Amostragem de ar interior, sedimentação gravitacional, impactador de ar.

ABSTRACT: (Comparison of spontaneous precipitation and impaction methods for microbiological analyzes of indoor air)

Microbial pollution is a key element of indoor air pollution; is caused by hundreds of species of bacteria and fungi. Two of the most widely used methods of air sampling are compared here: spontaneous sedimentation and solid-media impactation with one-stage Andersen sampler. Three collections were carried out in three environments with different characteristics in a University of Porto Alegre, Brazil: An auditorium with a capacity of 1164

people; and, in a small animal surgery center, at the recovery and induction anesthetic room, and at room surgery. In the auditorium the correlation coefficient was high ($r = 0.775$) and the coefficient of variation was lower in the passive samplings ($CV = 25.93$). In the surgical center samplings, the correlation coefficients were negative and the coefficients of variation were lower in the active methods. In all environments, opportunists fungi were identified such as *Penicillium* spp, *Aspergillus* spp, *Cladosporium* spp, among others.

Key words: Indoor air sampling, colon units, microbiology, spontaneous sedimentation, solid media impactor.

INTRODUÇÃO

Problemas na qualidade do ar em ambientes fechados vêm sendo registrados e apontados como importantes riscos à saúde humana. A qualidade do ar nestes ambientes vem se tornando cada vez mais importante visto que a população urbana passa, em média, 87% do seu tempo em ambientes fechados; no trabalho, em atividades físicas e lazer. Como a maior parte do ar inalado é ar contido nesses ambientes, o monitoramento e estudos sobre a qualidade desse ar são importantes (Klepeis, 2001; Morais *et al.*, 2010).

A poluição microbiana é um elemento-chave da poluição do ar interior. É causada por centenas de espécies de bactérias e fungos, em particular fungos filamentosos, crescendo em ambientes internos quando existe umidade suficiente e temperatura adequada (WHO, 1999). Em resumo, os edifícios modernos fechados propiciaram as condições necessárias para criar um nicho ecológico complexo que se tornou uma possível fonte de doenças para o homem (Sterling *et al.*, 1991).

De acordo com os padrões da Organização Mundial de Saúde, mais da metade dos locais fechados como empresas, escolas, cinemas, residências e até hospitais tem ar de má qualidade. Essa baixa qualidade é causada, principalmente, pela má higienização dos aparelhos de ar condicionado e pela falta de controle periódico sobre as possíveis fontes de contaminação (Schimer *et al.*, 2011)

Devido a crescente preocupação em monitorar estes ambientes internos, diferentes métodos de análise de ar foram testados, mas os estudos existentes não são conclusivos no que se refere à comparação entre dois dos principais métodos utilizados. No momento, o único meio efetivo de quantificar microrganismos no ar é limitado à contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC). A contagem de UFC é o parâmetro mais importante, pois determina os microrganismos vivos, presentes no ambiente, que podem se multiplicar. As

amostragens de ar mais usuais são feitas com amostrador de ar ativo (impactação em meio sólido) e amostragem passiva (sedimentação espontânea, método gravitacional) (Pasquarella *et al.*, 2000). Na amostragem ativa do ar a contaminação microbiana é medida contando o número de UFC por metro cúbico de ar (UFC/m³). Para isso são utilizados amostradores de ar ativo, que coletam um volume conhecido de ar soprado-o sob a superfície de um meio de cultura nutriente de preferência contidos em placas de Petri. Os diferentes modelos de impactadores são dotados de múltiplos estágios ou de apenas um estágio. Esta técnica de coleta de amostra simula o sistema respiratório humano, onde a árvore brônquica diminui seu diâmetro gradativamente desde o trato respiratório superior (1° estágio) até os alvéolos pulmonares (6° estágio) (NUNES, 2005). Já a amostragem passiva do ar, sedimentação espontânea, consiste em expor placas de Petri contendo um meio nutriente sólido de escolha deixado exposto ao ar por um determinado período de tempo. A indicação do tempo de exposição varia de 15 min à 1 h ou mais (Pasquarella *et al.*, 2000). Os resultados são expressos em UFC/área/tempo, ou simplesmente UFC/tempo.

No Brasil existem normas reguladoras da qualidade do ar, em especial aquelas estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Uma destas é a Resolução RE N° 09, de 16 de janeiro de 2003, que estabelece padrões de referência de qualidade do ar de interiores, em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo (Nunes, 2005).

O objetivo geral deste trabalho foi comparar dois dos principais métodos de análise microbiológicas da qualidade do ar de interiores - um método ativo com equipamento impactador em meio sólido e outro passivo, sedimentação espontânea em placas de Petri - visando elucidar divergências nos valores obtidos e obter parâmetro de comparação entre os dois métodos. Esperávamos com isso obter um padrão de comparação confiável entre os

métodos e a viabilidade de análises de ar interior eficiente e menos dispendiosa a partir do método de precipitação espontânea.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em uma universidade em Porto Alegre, Brasil e, para compor os dados de comparação entre os métodos, buscaram-se três ambientes com diferentes características: 1) auditório com capacidade 1164 pessoas, 2) sala cirúrgica e 3) sala de recuperação e indução anestésica de um centro cirúrgico de animais de pequeno porte. Todos ambientes analisados eram climatizados com condicionadores de ar e, no centro cirúrgico, foi relatado a existência de filtros de ar não absolutos. As amostragens foram realizadas entre novembro e dezembro de 2017.

O ar destes ambientes foi amostrado pelos métodos passivo e ativo, consecutivamente, em cada dia de amostragem. Foi observado o número de pessoas presentes nos ambientes para avaliar a associação entre o número de pessoas e contagem microbiana obtida. Foram, também, aferidas concentrações de CO₂, bem como temperatura e umidade relativa do ar em cada dia de amostragem.

As amostragens de ambos métodos foram realizadas utilizando meios comercialmente prontos de ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol 4% (SabC) e ágar trípticaseína de soja (TSA) para as culturas de fungos e bactérias, respectivamente.

As amostragens passivas foram realizadas conforme Pasquarella *et al.* (2000), que especifica o Índice de Contaminação Microbiana do Ar (IMA -*index of microbial air contamination*): placas de Petri padrão de 9 cm de diâmetro foram deixadas abertas ao ar de acordo com o esquema 1/1/1, por um período de 1 h, 1 m do chão, pelo menos a 1 m das

paredes ou qualquer obstáculo físico relevante. Os resultados foram expressos em UFC/4horas conforme preconizado pela RDC 17/2010 ANVISA e também em UFC/dm²/h.

As amostras ativas foram realizadas com impactador de ar em meio sólido, amostrador de Andersen de um estágio AES (Sampl'air Lite, Biomérieux, Hazelwood, EUA), com os meios de fungos e bactérias, consecutivamente. O volume de ar amostrado foi de 267 litros em 10 minutos (26,7 L.min⁻¹) para cada uma das culturas; volume dentro dos limites estabelecidos pela RE 09/2003. O crivo de aço inox por onde passa o ar foi sanitizado com almofadas para assepsia umedecidas com álcool isopropílico 70% (v/v) antes do início da coleta de cada ponto amostral.

Realizadas as coletas, as placas foram encaminhadas ao laboratório e incubadas em estufa microbiológica. As placas com os meios TSA foram incubadas à temperatura de 30 a 35 °C para cultivo de bactérias, com a contagem em 48 h. Os meios SabC incubados de 25 a 30 °C com contagem em 5 dias. As colônias de fungos foram mantidas em estufas após a contagem, por até 10 dias, para identificação do gênero com base nas suas estruturas macroscópicas e microscópicas. As colônias suspeitas de leveduras foram observadas ao microscópio óptico e reisoladas por esgotamento para o meio de cultura agar Cândida Cromogênico. Todas as análises laboratoriais foram realizadas no GRAM – Laboratório de Análises Microbiológicas Ltda., Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

RESULTADOS

Os pontos escolhidos possuem diferentes níveis de risco de contaminação e, por suas características, se afastam dos limites estabelecidos em estudos semelhantes. De qualquer maneira, é possível relacionar os valores obtidos com algumas classes estabelecidas, embora não seja esse o objetivo deste trabalho. Foram aferidas concentrações de CO₂, bem como

temperatura e umidade relativa do ar em cada dia de amostragem, mas estas últimas não apresentaram variação significativa dentro de cada um dos ambientes (Tabela 1).

Tabela 1: Valores obtidos pelos métodos passivo (UFC/4h e UFC/dm²/h) e ativo (UFC/m³), quantidade máxima de pessoas durante a coleta, concentração de CO₂, (ppm), temperatura (°C) e Umidade Relativa (%) em cada uma das amostragens; evidenciado os coeficientes de correlação entre os métodos de coleta; bem como a correlação entre cada método e as variáveis quantidade de pessoas, CO₂, temperatura e umidade relativa.

	UFC/4h	UFC/dm ² /h	UFC/m ³	Quantidade Máxima de Pessoas	CO ₂ (ppm)	Temperatura (°C)	Umidade Relativa (%)			
Auditório	108	21	787	482	946	22,1	61,8			
	136	27	2150	442	823	22,6	62,1			
	80	16	1019	700	927	24,9	60,8			
Coeficiente de correlação (r)	0,775			passivo	ativo	passivo	ativo	passivo	ativo	
				-0,929	-0,487	-0,785	-0,9999	-0,770	-0,194	0,955
Sala de recuperação e indução anestésica	156	31	2850	3	948	24,6	54,2			
	300	59	1723	3	938	24,4	53,4			
	1492	293	1787	4	965	24,7	55,7			
Coeficiente de correlação (r)	-0,541			passivo	ativo	passivo	ativo	passivo	ativo	
				0,995	-0,456	0,890	-0,098	0,688	0,238	0,901
Sala cirúrgica	44	9	1700	0	1126	24,7	63,1			
	220	43	1412	6	1503	23,7	60,1			
	28	6	1719	2	1050	25,1	65,1			
Coeficiente de correlação (r)	-0,9998			passivo	ativo	passivo	ativo	passivo	ativo	
				0,918	-0,926	0,997	-0,995	-0,979	0,974	-0,945

No auditório a média das amostragens ativas de fungos foi de 552 UFC/m³; dentro do Valor Máximo de Referência (VMR) estabelecidos na RE 09/2003 da ANVISA a qual se aplica a este ambiente (VMR ≤ 750 UFC/m³). A contagem total, meios SabC e TSA, do método ativo foi de 1318 ufc/m³ com o coeficiente de variação (CV) de 55,32%. Já o método passivo teve média de 108 ufc/4h, ou ainda 21 UFC/dm²/h com CV= 25,93%. O coeficiente de correlação entre as amostras passivas e ativas se apresentou relativamente forte ($r = 0,775$ e $r^2 = 0,6$) (Figura 1). Das coletas pelo método ativo neste ambiente foi possível identificar os gêneros de, por ordem de prevalência, *Cladosporium* spp.; *Penicillium* spp.; *Aspergillus* spp.; *Trichoderma* spp.; *Rhodotorula* spp.; além de fungos dos grupos hialinos e dematiáceos, os quais não foi possível observar estruturas que permitissem identificação mais detalhada. Já nas coletas pelo método passivo foram identificados *Cladosporium* spp.; hialinos e dematiáceos. A concentração média de CO₂ foi de 899ppm.

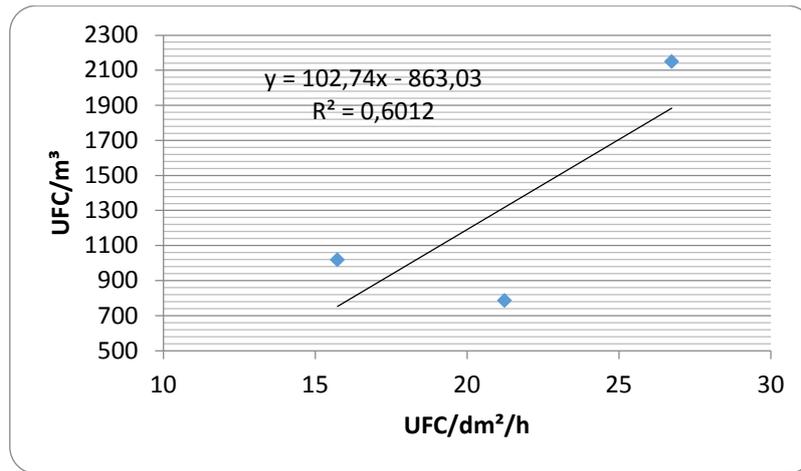


Figura 1: Correlação entre os métodos passivo (UFC/dm²/h) e ativo (UFC/m³) do auditório.

Na sala de recuperação e indução anestésica do centro cirúrgico de animais de pequeno porte a amostragem ativa teve média de 2120 UFC/m³ (CV = 29,87%). A amostragem passiva teve média de 108 UFC/4h, 21 UFC/m²/h (CV = 112,96%). O coeficiente de correlação foi negativo e moderado ($r = -0,541$ e $r^2 = 0,29$) (Figura 2). Os gêneros identificados pelo método ativo foram: *Apergillus* spp.; *Penicilium* spp.; *Cladosporium* spp.; *Alternaria* spp.; *Rhodotorula* spp.; *Trichoderma* spp.; *Fusarium* spp.; hialinos e, pelo método passivo: *Penicillium* spp.; *Aspergillus* spp.; *Cladosporium* spp.; *Phoma* spp.; grupos de dematiáceos, hialinos e *Candida glabrata*. A concentração média de CO₂ foi de 950 ppm.

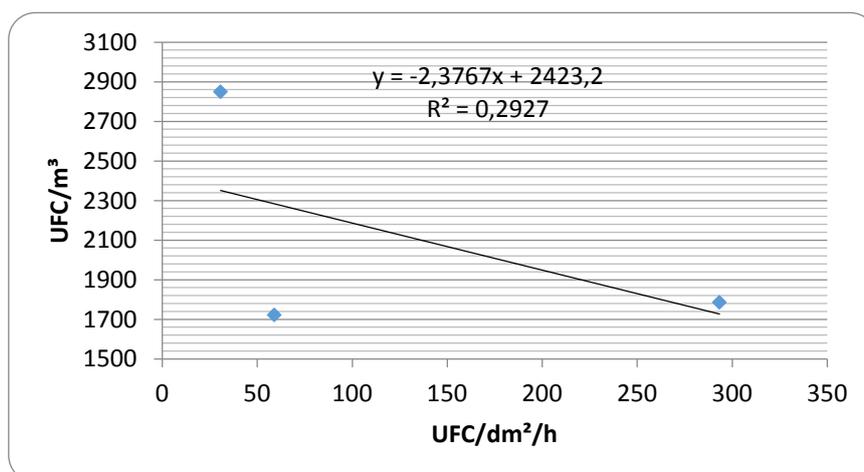


Figura 2: Correlação entre os métodos passivo (UFC/dm²/h) e ativo (UFC/m³) da sala de recuperação e indução anestésica.

Na sala cirúrgica do centro cirúrgico de animais de pequeno porte a amostragem ativa teve média de 1610 UFC/m³ (CV= 10,69%). A amostragem passiva teve média de 97 UFC/4h, 19 UFC/m²/h (CV = 109,45%). O coeficiente de correlação foi muito forte, porém negativo ($r = -0,999$ e $r^2 = 0,99$) (Figura 3). Os gêneros identificados pelo método ativo foram *Penicillium* spp.; *Aspergillus* spp.; *Cladosporium* spp.; *Rhizopus* spp.; *Trichoderma* spp.; *Colletotrichum* spp.; *Rhodotorula* spp.; *Mucor* spp. e alguns do grupo hialinos. Pelo método passivo *Aspergillus* spp.; *Rhodotorula* spp.; *Penicillium* spp.; *Trichoderma* spp.; dematiáceos, hialinos e *Candida glabrata*. A concentração média de CO₂ foi de 1226 ppm.

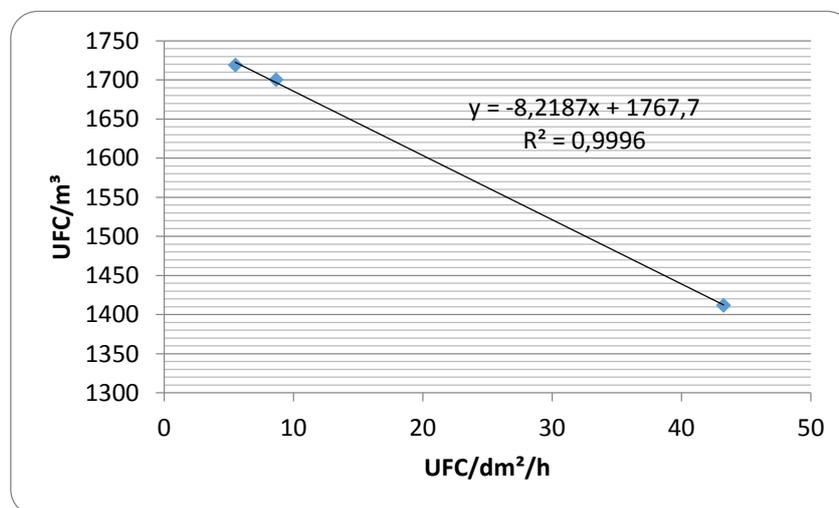


Figura 3: Correlação entre os métodos passivo (UFC/dm²/h) e ativo (UFC/m³) da sala cirúrgica.

DISCUSSÃO

Em qualquer ambiente, o número de microrganismos que precipitam está relacionado ao número de microrganismos presentes no ar: quanto maior a contaminação do ar, maior o número de microrganismos sedimentáveis devido à gravidade (Pasquarella *et al.*, 2000). As amostragens no auditório foram as que mais se aproximaram desta lógica quando comparados os dois métodos de análises ($r = 0,775$) (Figura 1). O mesmo não foi observado nos ambientes do centro cirúrgico de animais de pequeno porte, onde os coeficientes de correlação foram

negativos (Figuras 1 e 2). A relação negativa nos ambientes do centro cirúrgico talvez possa ser explicada pela alta dinamicidade destes ambientes, onde há fluxo de pessoas e animais constante. Nestes ambientes foi observada alta correlação entre o número de pessoas e a contagem total de UFC pelo método passivo; $r = 0,995$ e $r = 0,918$ para a sala de recuperação e sala cirúrgica, respectivamente. As mesmas dinâmicas não foram observadas para as coletas ativas em nenhum dos três ambientes; indicando que o método passivo é mais sensível à presença de pessoas.

A escolha em realizar as coletas passivas e ativas de maneira consecutiva, ao invés de simultâneas, talvez justifiquem a baixa correlação entre os métodos de coleta no centro cirúrgico, uma vez que a microbiota dispersa no ar é dinâmica no espaço-tempo. Optou-se por essa metodologia, pois, além da limitação técnica, os ambientes analisados possuem contaminação elevada e a turbulência gerada pelo amostrador ativo poderia alterar a contagem da amostragem passiva (Ljungqvist, 1994 *apud* Pasquarella, 2000)

Outro aspecto importante foram as altas concentrações de CO₂, sobretudo na sala cirúrgica. Este fato evidencia a baixa taxa de renovação do ar nestes ambientes, o que pode afetar a precipitação dos microrganismos e, por conseguinte, a correlação entre os métodos.

A diferença de tempo de amostragem entre os métodos é outro aspecto importante a ser considerado. Enquanto a amostragem passiva teve tempo de exposição de uma hora; a amostragem ativa foi de dez minutos. O tempo que as placas de sedimentação ficam expostas às variações ambientais são maiores e isso se refletiu nos altos coeficientes de variação obtidos; sobretudo nas amostragens do centro cirúrgico de animais de pequeno porte.

Os gêneros de fungos filamentosos identificados podem causar infecção em pacientes suscetíveis. O gênero *Aspergillus* spp. é o mais citado na literatura como fungo oportunista, especialmente em pacientes imunossuprimidos. A inalação de esporos é a via mais comum de

transmissão e os surtos de aspergilose são associados a reformas e construções, dentro e ao redor de hospitais. Doença pulmonar e, mais raramente, sinusite, são as manifestações de aspergilose. Diferentes espécies de *Candida* também podem causar quadros de fungemia. Um grupo europeu realizou na década de 90 um estudo multicêntrico e, por análise univariada, concluíram ser *C. glabrata*, a espécie associada à maior taxa de mortalidade e que óbito estava relacionado com maior idade e severidade da doença de base do paciente. O gênero *Candida* é, sem dúvida o mais importante, mas existem outras leveduras no ambiente hospitalar, tanto em vegetais, ar atmosférico e água, quanto na pele e no trato gastrointestinal dos pacientes e funcionários, que podem causar quadros infecciosos; tal como o gênero *Rhodotorula* spp. também identificado em nossa amostragens (Brasil, 2004).

O método gravitacional é considerado um método de coleta não quantitativo; porém o fato das amostragens no auditório terem coeficiente de correlação forte e positivo mostram que talvez seja possível realizar monitoramento passivo, mesmo que o uso de placas de sedimentação não seja indicado para esse tipo de ambiente (Napoli, 2011). De qualquer forma, mais estudos desta natureza são necessários para confirmar esta tendência.

A qualidade microbiológica do ar é um parâmetro significativo para controlar riscos à saúde. O monitoramento microbiano regular é importante para avaliar a qualidade ambiental e identificar situações críticas que requerem intervenção corretiva. O conteúdo microbiológico do ar pode ser monitorado por dois métodos principais, um ativo e um passivo (Napoli, 2011). Preconizar coletas passivas é importante, pois, segundo Pasquarella *et al.* (2000), as placas de assentamento são estéreis, econômicas e de fácil obtenção; apresentam resultados reprodutíveis e confiáveis.

AGRADECIMENTOS

À professora Sueli T. Van Der Sand pelos ensinamentos e orientação neste trabalho; ao Gram- Laboratório de Análises Microbiológicas Ltda. pelo apoio, insumos e equipamentos para realizar este trabalho; à Universidade Federal do Rio Grande do Sul que possibilitou essa jornada.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003. Resolução n° 9. Orientação técnica elaborada por grupo técnico assessor sobre padrões referenciais de qualidade do ar interior em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. Detecção e identificação de Fungos de Importância Médica. Disponível em <
http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf> Acesso em: 27 dez. 2017.

EUROPEAN UNION, 2003. Guidelines of good manufacturing practices for medicinal products for human and veterinary use. Disponível em:<
https://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4_en>. Acesso em: 23 ago. 2017.

EUROPEAN UNION, 1997. Guide to Manufacture of Sterile Medicinal Products.

FRIBERG, B., FRIBERG, S., BURMAN, L. G. 1999 Inconsistent Correlation between aerobic bacterial surface and air counts in operating rooms with ultra clean laminar air flows: proposal of a new bacteriological standard for surface contamination, *The Journal of Hospital Infection, Londres, v. 42, p. 287-293.*

KLEPEIS, E. 2001 The National Human Activity Pattern Survey (NHAPS): a resource for assessing exposure to environmental pollutants. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, Boston, v. 11, n. 3, p. 231-252.

NAPOLI, C. MARCOTRIGIANO, V., MONTAGNAL, M. 2012. Air sampling procedures to evaluate microbial contamination: a comparison between active and passive methods in operating theatres. *BMC Public Health*, 12:594

MORAIS, G., SILVA, M., CARVALHO, M., SANTOS, J., DOLINGER, E; BRITO, D. 2010. Qualidade do ar em uma instituição de ensino superior brasileira. *Biosci.*, v. 26, n. 2, p. 305-310.

NUNES, G. 2005. Estudo da qualidade microbiológica do ar de ambientes internos climatizados. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro..

PASQUARELLA, C.; PITZURRA, O.; SARNO, A. 2000. The index of microbial air contamination. *The Journal of Hospital Infection, London*, v. 46, p. 241-256.

SCHIMER, W., PIAN, L.; SZYMANSKI, M. & GAUER, M, 2011. A poluição do ar em ambientes internos e a síndrome dos edifícios doentes. *Ciência & Saúde Coletiva*, 16(8):3583-3590.

STERLING, T.; COLLETT, C. & RUMEL, D. 1991. A epidemiologia dos "edifícios doentes" *Rev. Saúde Públ., S. Paulo* 25(1),

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2009. Guidelines for indoor air quality: dampness and mould; Copenhagen, Denmark. ISBN 978 92 890 4168 3.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2008. Programmes and projects: indoor air pollution.

Disponível em: <<http://www.who.int/indoorair/en>> Acessado em: 06 jun. 2017

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Correlação entre os métodos passivo (UFC/dm²/h) e ativo (UFC/m³) do auditório

Figura 2. Correlação entre os métodos passivo (UFC/dm²/h) e ativo (UFC/m³) da sala de recuperação e indução anestésica

Figura 3. Correlação entre os métodos passivo (UFC/dm²/h) e ativo (UFC/m³) da sala cirúrgica

Tabela 1: Valores obtidos pelos métodos passivo (UFC/4h e UFC/dm²/h) e ativo (UFC/m³), quantidade máxima de pessoas durante a coleta, concentração de CO₂, (ppm), temperatura (°C) e Umidade Relativa (%) em cada uma das amostragens; evidenciado os coeficientes de correlação entre os métodos de coleta; bem como a correlação entre cada método e as variáveis quantidade de pessoas, CO₂, temperatura e umidade relativa.