

Avaliação microbiológica da qualidade do ar de interiores: aspectos metodológicos e legais*

Microbiological evaluation of indoor air quality: legal and methodological aspects

Cristiane Caldeira¹
 Octavio Augusto França Presgrave²
 Aurea Maria Lage de Moraes³
 Isabella Fernandes Delgado⁴

Resumo

A contaminação microbiológica do ar de interiores é um grave problema de saúde pública por estar associada a alergias e a doenças respiratórias. O objetivo desta revisão foi apresentar e discutir os métodos utilizados na avaliação microbiológica da Qualidade do Ar de Interiores (QAI) e os aspectos legais em relação aos Valores Máximos Recomendáveis (VMR). A amostragem ativa por impactação em meio sólido tem sido o método mais utilizado, entretanto, diferenças metodológicas contribuem para a dificuldade de padronização dos VMR. Os testes *in vitro* são considerados uma nova ferramenta para esse tipo de avaliação, entretanto, faltam estudos que utilizem tais métodos para todos os tipos de ambientes. As limitações da Resolução RE nº 9/2003 indicam a necessidade de uma nova legislação principalmente para serviços de saúde.

Palavras-chave: Poluição do ar de interiores. Monitoramento ambiental. Bioaerossóis. Vigilância Sanitária.

Abstract

The microbial indoor air contamination is a serious public health problem since it is associated with allergies and respiratory diseases. This review aimed to present and discuss different methods used to evaluate the microbiological indoor air quality (IAQ) and the legal aspects related to maximum acceptable levels (MAL). Active air sampling by impactor sampler on a solid medium has been the most widely used method, however, differences between methods and difficulties in recovery of microorganisms contribute to the difficulty of standardizing MAL. The *in vitro* tests are considered a new tool for this type of evaluation, however, there are few studies that use these methods for all types of environments. The limitations of the Act nº 9/2003 indicate the need for new legislation mainly for health.

Keywords: Indoor air pollution. Environmental monitoring. Bioaerosol. Sanitary Surveillance.

* Artigo recebido em 07/2011
 Aprovado em 03/2012

¹ Mestre em Ciências, Tecnologista Pleno em Saúde Pública, DFT/INCQS/FIOCRUZ. Av. Brasil 4365 - Manguinhos. Rio de Janeiro – CEP: 21040-900. Fone: (21) 38655277 Fax: (21) 22900915. E-mail: cristiane.caldeira@incqs.fiocruz.br.

² Mestre em Ciências, Tecnologista Sênior em Saúde Pública, DFT/INCQS/FIOCRUZ.

³ Doutora em Biologia Celular e Molecular e Pesquisadora Titular IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

⁴ Doutora em Ciências, bolsista de Produtividade do CNPq e Vice-Diretora de Pesquisa e Ensino, INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

1 Introdução

Problemas relacionados à qualidade do ar de interiores (QAI) são mundialmente reconhecidos como um fator de risco para a saúde humana e uma importante questão de Saúde Pública (NUNES et al., 2005; QUADROS et al., 2009). Recentemente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) apontou a poluição do ar de interiores como responsável por 2,7% dos casos de doenças respiratórias e alérgicas no mundo, causadas principalmente pela presença de bioaerossóis no ambiente (WHO, 2009).

Essas partículas são numerosas e diversificadas, compreendendo vírus, bactérias, esporos fúngicos, poeiras orgânicas, componentes da parede celular das bactérias Gram-negativas (endotoxinas) e Gram-positivas (ácido lipoteicoico), pelos de animais, pólen e poeira do ácaro doméstico (PANTOJA et al., 2007). Como consequência da presença dessas substâncias nas vias aéreas e circulação sanguínea, macrófagos e monócitos que expressam CD14 podem ser ativados iniciando uma cascata de transdução de sinal com liberação de uma variedade de mediadores inflamatórios, especialmente IL-1 β , TNF- α e IL-6 (BERNASCONI et al., 2010; BONETTA et al., 2010).

Quando a exposição a esses agentes ocorre em áreas hospitalares, principalmente áreas críticas onde os pacientes possam estar imunossuprimidos, as consequências podem ser mais complexas levando ao agravamento da doença e em alguns casos ao óbito (NUNES et al., 2005; PEREIRA et al., 2005; ORTIZ et al., 2009; QUADROS et al., 2009). Da mesma forma, áreas laboratoriais que necessitem de ambientes estéreis devem ter um controle adequado para evitar a contaminação do ambiente e garantir a qualidade das análises (PASQUARELLA et al., 2000).

Ao contrário dos riscos químicos ou físicos, a avaliação da exposição aos riscos biológicos não possui metodologias e padrões referenciais adequados (NUNES et al., 2005; BERNASCONI et al., 2010). O procedimento de amostragem é realizado por coleta de ar e poeira de forma passiva e ativa, e muitos métodos diferentes podem ser usados na quantificação e na identificação desses microrganismos (PASQUARELLA et al., 2000). Essas diferenças contribuem para a dificuldade na comparação dos resultados e, conseqüentemente, para a padronização de Valores Máximos Recomendáveis (VMR), limites que separam as condições de ausência e presença do risco de agressão à saúde humana (NUNES et al., 2005). Recentemente,

em estudos foram utilizados testes in vitro como a dosagem de mediadores inflamatórios no sangue total humano e linhagens celulares que respondem a todos os contaminantes biológicos presentes nas amostras de ar ou poeira, assim como métodos de dosagem de endotoxinas (KINDINGER et al., 2005; DANESHIAN; von AULOCK; HARTUNG, 2009; LIEBERS et al., 2009; SCHINDLER et al., 2009).

A concentração de microrganismos viáveis e cultiváveis, principalmente fungos totais e bactérias, é utilizada como padrão referencial microbiológico para avaliação da QAI. Esse padrão é um parâmetro utilizado como sentinela para determinar a necessidade da busca das fontes poluentes ou das intervenções ambientais (BRASIL, 2003a; WHO, 2009). Um grande problema na determinação dos critérios de avaliação desses microrganismos, de forma a serem universalmente válidos, é a dificuldade de medição de uma resposta proporcional do corpo humano à contaminação externa. A concentração de microrganismos vivos e cultiváveis pode não representar o potencial risco biológico do ambiente devido à presença de outros contaminantes não mensuráveis pelos métodos disponíveis (SCHINDLER et al., 2009). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamentou, por meio da Resolução RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003, as orientações técnicas para os “Padrões Referenciais da Qualidade do Ar de Interiores em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo”. Nessa Resolução foi definido em termos de contaminação biológica apenas o VMR para fungos totais (BRASIL, 2003a; QUADROS et al., 2009). Devido à falta de legislação adequada, alguns estudos estabeleceram por meio de análises em áreas residenciais, ocupacionais e hospitalares, valores aceitáveis para a contaminação microbiológica que, juntamente aos valores estabelecidos por órgãos internacionais, servem para fins comparativos (DUTDIEWICZ, 1997; PASQUARELLA; PITZURRA; SAVINO, 2000; BOUILLARD et al., 2005). O objetivo desta revisão foi apresentar e discutir os diferentes métodos utilizados na avaliação microbiológica da QAI e os aspectos legais em relação aos VMR atualmente utilizados.

2 Amostragem e avaliação de bioaerossóis

O monitoramento de bioaerossóis inclui a medição de microrganismos viáveis (cultiváveis e não culti-

váveis) e componentes ou partes desses microrganismos por coleta passiva e ativa. Entretanto, a maioria dos métodos empregados representa apenas aproximações da concentração de fungos ou bactérias em ambientes reconhecidamente contaminados (PASQUARELLA; PITZURRA; SAVINO, 2000; KINDINGER et al., 2005).

O método de coleta passivo ou método gravitacional é realizado por sedimentação de microrganismos dispersos no ar em placas de Petri com meio de cultura específico e posterior contagem de UFC por superfície ou por tempo de amostragem (UFC/dm² e UFC/h). É considerado um método limitado devido principalmente à falta de padronização do tempo de exposição, o que limita a quantificação desses microrganismos (PANTOJA; COUTO; PAIXÃO; 2007). Além disso, a coleta passiva possui baixa sensibilidade para pequenas partículas como esporos que não se depositam somente pela ação da gravidade e pode sofrer influência direta da movimentação do ar no ambiente avaliado (NUNES et al., 2005). Entretanto, devido a sua simplicidade, baixo custo e o fornecimento de informações qualitativas sobre a exposição, ainda é utilizado principalmente para monitorar salas limpas e ambientes controlados (PASQUARELLA; PITZURRA; SAVINO, 2000).

Na amostragem ativa são utilizados equipamentos que coletam um volume conhecido de ar direcionado em um meio nutriente por diferentes técnicas, quantificando os padrões referenciais a partir da contagem de UFC/m³. Os processos mais utilizados são por impactação em meio sólido por amostradores do tipo linear de 1, 2 ou 6 estágios, que podem simular o trato respiratório humano em função do tamanho das partículas retidas (PASQUARELLA; PITZURRA; SAVINO, 2000; NUNES et al., 2005). Apesar da vantagem de se determinar o número de partículas respiráveis e, portanto, seu potencial em causar infecções, os impactadores de múltiplos estágios são menos precisos, possuem um maior custo e são mais difíceis de serem manuseados do que os de um estágio (NUNES et al., 2005).

Outras técnicas por amostragem ativa podem ser utilizadas como a impactação em meio líquido e por centrifugação, filtração (através de um filtro de membrana) e precipitação eletrostática (Tabela 1). A determinação da estimativa de poeira no ar por métodos gravimétricos também tem sido utilizado; entretanto, somente a quantidade de poeira não fornece nenhuma indicação de ati-

vidade biológica dos componentes presentes na amostra (NUNES et al., 2005; QUADROS et al., 2009).

O emprego de diferentes tipos de amostragem, técnicas e equipamentos podem influenciar a quantificação dos microrganismos presentes no ambiente, gerando problemas na avaliação dos resultados em função dos diferentes níveis de eficiência e custo. A dificuldade de comparação de resultados dependendo do método de amostragem foi apresentada em avaliações de salas cirúrgicas demonstrando que o número de UFC/m³ de espécies patogênicas obtidos com o método de sedimentação foi em média inferior aos encontrados por impactação (FLEISCHER et al., 2006).

A identificação dos microrganismos presentes no ambiente também é uma tarefa difícil e extremamente trabalhosa. Podem ser utilizados métodos morfológicos e de coloração por microscopia clássica e dosagens de componentes químicos como ATP, enzimas e DNA por metro cúbico de ar (ACGIH, 1989; PASQUARELLA; PITZURRA; SAVINO, 2000). A utilização da microscopia eletrônica ou por varredura, fluorescência e técnicas de biologia molecular ou imunológica como citometria de fluxo, reação em cadeia da polimerase em tempo-real, análise do polimorfismo de fragmentos de restrição enzimática e ensaios imuno-enzimáticos também são ferramentas importantes na identificação tanto dos microrganismos vivos como partes ou constituintes desses contaminantes. Certas espécies de microrganismos de crescimento lento podem ser demasiadamente exigentes para crescer em cultura de laboratório sendo difíceis de serem identificadas (PASQUARELLA; PITZURRA; SAVINO, 2000; LIEBERS et al., 2009).

Métodos de cultura tradicionais provaram ser de uso limitado para avaliação da exposição, fornecendo dados quantitativos de pouca reprodutibilidade, selecionando determinadas espécies em função do método de amostragem e meios de cultura específicos (WHO, 2009). Além disso, os métodos existentes nem sempre permitem a coleta ideal de microrganismos, bem como partes deles, que são reconhecidamente importantes na contaminação do ar ambiente e que se relacionam com efeitos à saúde humana, por exemplo, as endotoxinas (SCHINDLER et al., 2009).

A contagem de fungos totais, apesar de ser um padrão referencial que melhor representa o nível de ocupação

do ambiente e recomendado pela Resolução RE 09/2003, pode não ser o mais adequado para os hospitalares, por exemplo, nos quais, bactérias são responsáveis por grande número de infecções (BRASIL, 2003a; NUNES et al., 2005; QUADROS et al., 2009). Alguns estudos demonstraram

que quantidades significativas de bactérias e leveduras podem crescer em meios específicos para fungos, necessitando ser esclarecido se a contagem deve ser somente de fungos filamentosos ou se as leveduras devem ser incluídas (QUADROS et al., 2009; DASCALAKI, 2009).

Tabela 1: Comparação entre as coletas de ar por amostragem ativa e passiva

AMOSTRAGEM	PASSIVA	ATIVA
ANÁLISES	-Qualitativa; -Microorganismos viáveis e cultiváveis.	-Quantitativa; -Permite a detecção de microrganismos viáveis e cultiváveis e partes desses microrganismos; -Possibilidade do uso de métodos <i>in vitro</i> : *LAL: solução após lavagem do filtro amostrado para detecção de endotoxinas; -*TAM: contato direto do filtro amostrado com sangue total humano fresco ou cultura de linhagens monocíticas. Dosagem de citocinas para contaminantes biológicos em geral.
	-Baixo custo; -Maior disponibilidade de uso; -Maior número de análises em menor tempo.	-Preconizada por diretrizes oficiais; -Mais sensível; -Mais eficiente; -Permite avaliação de partículas de vários tamanhos incluindo as alveolares.
DESVANTAGENS	-Dificuldade na detecção de partículas pequenas como esporos fúngicos; -Influência do tempo de amostragem que não é definido.	-Variedade de equipamentos dificulta comparação e a reprodutibilidade dos resultados; -Necessidade de constante calibração do equipamento.

*LAL- Lisado dos Amebócitos de *Limulus*; TAM – Teste de Ativação de Monócitos.

Recentemente, novos estudos comprovam a importância do uso de métodos toxicológicos *in vitro* que avaliem a atividade biológica e tornem possível a quantificação de todos os contaminantes biológicos presentes no ar ambiente (LIEBERS et al., 2009; SCHINDLER et al., 2009; BERNASCONI et al., 2010) e sua relação com doenças respiratórias (CASTRO et al., 2005). Dentro desse contexto, no qual a amostragem e a análise da qualidade do ar são os primeiros passos para determinar se o ambiente apresenta uma ameaça potencial para as pessoas expostas, os modelos *in vitro* contribuem como uma importante ferramenta nas amostragens de medição (KINDINGER et al., 2005; BLAAUBOER; 2008; BERNASCONI et al., 2010).

As metodologias empregadas são adaptações de métodos utilizados para a avaliação de contaminantes biológicos em produtos injetáveis de uso humano e recentemente incorporados na Farmacopeia Europeia especificamente para esses produtos (BERNASCONI et al., 2010). A amostragem do ar é realizada por coleta ativa com o uso de bombas individuais com fluxo definido e sistemas coletores formados por cassetes e filtros específicos (DANESHIAN; von AULOCK; HARTUNG, 2009).

Atualmente, dois métodos *in vitro* têm sido utilizados: o Teste de Endotoxina Bacteriana e o Teste de Ativação de Monócitos (KINDINGER et al., 2009). O Ensaio de Endotoxina Bacteriana é baseado na reação do lisado de amebócitos do caranguejo-ferradura (*Limulus*

polyphemus) com a endotoxina e por isso também conhecido como Lisado de Amebócitos do *Limulus* (LAL). Para a análise deve ser realizada a lavagem dos filtros, cujo extrato é centrifugado e usado para dosar especificamente endotoxinas por uso de kits comerciais, sendo sua potência expressa em unidades de endotoxina (UE)/m³ de ar ou UE/mg de poeira. O resultado deve ser sempre comparado ao segundo padrão internacional de endotoxina (*Escherichia coli* sorotipo O113: H10). Assim, esse ensaio reflete apenas uma pequena parte do todo espectro de microrganismos transportados por via aérea. Além disso, como a endotoxina é medida apenas na forma livre, complexos formados com proteínas e outras partículas contidas nos bioaerossóis como fungos, glicanos e DNA são interferentes nesse ensaio, que tem também como limitação o fato de não poder ser usado diretamente em amostras sólidas como poeiras e particulados e nem amostras que possuam alguma coloração (SCHINDLER et al., 2009). Além disso, estudos em ambientes domésticos indicam que a atividade biológica encontrada em extratos de poeira não é mediada apenas por endotoxina, e sim por bactérias Gram-positivas e outros contaminantes que não são detectados por LAL (LIEBERS et al., 2009).

Devido às limitações do LAL, foi desenvolvido o Teste de Ativação de Monócitos que detecta todos os tipos de contaminantes biológicos por meio da dosagem de mediadores inflamatórios em sangue total humano (TNF- α ; IL1- β e IL-6) e culturas de células monocíticas, principalmente a MonoMac 6, após contato direto do sangue humano com o filtro amostrado. Os resultados são expressos em unidades equivalentes de endotoxina (UEE)/m³ de ar sempre comparado ao padrão internacional de endotoxina da OMS (RIEHELMANN et al., 2007; BERNASCONI et al., 2010). A vantagem dessa metodologia reside no fato de refletir a carga biológica presente no ambiente independentemente da sua origem, incluindo microrganismos viáveis cultiváveis e não cultiváveis e substâncias potencialmente alergênicas (DANESHIAN; von AULOCK; HARTUNG et al., 2009; KINDINGER et al., 2009; SCHINDLER et al., 2009; LIEBERS et al., 2009; BERNASCONI et al., 2010). Algumas críticas dizem respeito ao perfil individual de liberação de citocinas dos doadores, já que essa resposta pode ser influenciada por fatores como ritmo circadiano, polimorfismo genético do receptor TLR4, além da dificuldade de obtenção de quantidades significativas de sangue de apenas

um doador. Entretanto, segundo Schindler et al. (2009), a utilização do pool de sangue de 3 a 5 doadores, assim como a criopreservação do sangue podem contornar esse problema diminuindo as diferenças interindividuais entre os doadores.

A dosagem de mediadores inflamatórios no sangue total humano de trabalhadores expostos à Sílica foi utilizada por Castro et al. (2005) como indicador de predição para a fibrose pulmonar. Nesse estudo, foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa nas médias de IL-1 β , TNF- α e IL-6 entre o grupo exposto e o não exposto, apontando a possibilidade do uso dos níveis de citocinas como um biomarcador da gravidade da fibrose pulmonar causada pela exposição à Sílica.

3 Normas, diretrizes e aspectos legais sobre a QAI

Devido ao grande número de contaminantes e poluentes existentes no ar de interiores e seus efeitos adversos, várias normas e diretrizes foram elaboradas por uma variedade de agências não havendo tanto consenso mundial quanto harmonização de metodologias (QUADROS et al., 2009).

Grande parte dos parâmetros definidos para QAI no Brasil são extrapolações dos limites estabelecidos por órgãos internacionais e normalmente relacionados a ambientes ocupacionais para parâmetros físicos e químicos (BRICKUS; AQUINO NETO, 1999). Para tal, são utilizados: os limites para ambientes urbanos definidos pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (Environmental Protection Agency - EPA) e OMS; os valores de referência do Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional dos Estados Unidos (National Institute for Occupational Safety and Health - NIOSH) e os limites de exposição ocupacional (Occupational Exposure Level - OEL) adotados pela Administração de Segurança e Saúde Ocupacional dos Estados Unidos (Occupational Safety and Health Administration - OSHA) (QUADROS et al., 2009). No caso da avaliação dos riscos biológicos, as normas e diretrizes variam entre os órgãos e agências regulatórias assim como VMR (tabela 2).

No caso de exposições ocupacionais a bioaerossóis, não existem valores de OEL ou Limites de Tolerância (Threshold Limit Values - TLV) reconhecidos por órgãos

regulatórios (PASQUARELLA; PITZURRA; SAVINO, 2000). O NIOSH preconiza até 1000 UFC/m³ como valor máximo recomendável (ROOS et al., 2004). Os valores de OEL de 104 UFC/m³, citados por Dutkiewicz et al. (1997) para os microrganismos totais estabelecidos em ambientes com grandes quantidades de poeira orgânica como na agricultura, têm sido utilizados para fins comparativos em alguns estudos. Algumas recomendações foram estabelecidas pelo Comitê sobre bioaerossol da Conferência Americana de Higiênistas Industriais Governamentais (American Conference of Governmental Industrial Hygienists - ACGIH), a qual, baseada em estudos anteriores, estabeleceu que a concentração de fungos anemófi-

los em ambientes externos “rotineiramente excede 1000 UFC/m³ e podem alcançar em média 10.000 UFC/m³ nos meses de verão”. Esse mesmo Comitê estabeleceu como OEL o limite de 250 UFC/m³ para ambientes fechados. A ACGIH também adverte que concentrações menores que 100 UFC/m³ podem ser consideradas insalubres em ambientes que atendam indivíduos imunossuprimidos (BOUILLARD et al., 2005). Portanto, a concentração de microrganismos presente no ambiente não deve apenas ser quantificada, mas avaliada também sobre seu potencial toxigênico, levando-se em consideração que a baixa concentração de microrganismos no ar, por si só, não indica um ambiente limpo e saudável (ACGIH, 1989).

Tabela 2: Normas e diretrizes de órgãos governamentais, agências regulatórias e estudos científicos para avaliação de bioaerossóis

AGÊNCIAS E ÓRGÃOS REGULATÓRIOS			
REFERÊNCIA	AMBIENTE	PADRÃO REFERENCIAL	VALOR
ACGIH	Ocupacional OEL	Fungos	250 UFC/m ³
NIOSH	Ocupacional OEL	Microrganismos totais	1000 UFC/m ³
OMS	Limites para ambientes urbanos	Fungos	500 UFC/m ³
ANVISA	Ambientes coletivos VMR	Fungos totais	750 UFC/m ³
NRCC	População não exposta VR	Fungos totais	150 UFC/m ³
		Fungos anemófilos	100 UFC/m ³
ARTIGOS CIENTÍFICOS			
DUTKIEWICZ, 1997	Ocupacional - OEL	Microrganismos totais	10 ⁴ UFC/m ³
DACARRO et al.(2000)	Ambientes coletivos GIMC	Microrganismos totais	1000 GIMC/m ³
PASQUARELLA et al. (2000)	Hospital-IMA	Microrganismos totais	Alto risco 25 UFC/h
			Médio risco 5 UFC/h
			Baixo risco 750 UFC/h
GÓRNY e DUTKIEWICZ (2002)	Ocupacional (poeira orgânica) OEL	Fungos	5 × 10 ³ UFC/m ³
		Bactéria	100 × 10 ³ UFC/m ³
		Endotoxina(LAL)	2000 UE/m ³
	População não exposta RLV	Fungos	5 × 10 ³ UFC/m ³
		Bactéria	5 × 10 ³ UFC/m ³
		Endotoxinas (LAL)	50 UE/m ³
KINDINGER et al. (2005)	Criadouro de animais	Aves	Contaminantes biológicos (TAM) 7,5 x 10 ³ a 3,8 x 10 ⁵ UEE/m ³
		Estábulo	Contaminantes biológicos (TAM) 0,1 a 16x10 ⁶ UEE/m ³
BERNASCONI et al. (2010)	População não exposta	Contaminantes biológicos (TAM)	150 UEE/m ³

ACGIH - Conferência Americana de Higiênistas Industriais e Governamentais; NIOSH - Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional dos Estados Unidos; OMS - Organização Mundial da Saúde; ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; NRCC - Conselho Nacional de Pesquisas Canadense; OEL- Limite de Exposição Ocupacional; GIMC - Índice Global de Contaminação Microbiana; IMA - Índice de Contaminação Aérea Microbiana; RLV - Valores Limites Residenciais; LAL - Lisado dos Amébocitos de Limulus; TAM- Teste de Ativação de Monócitos.

Alguns órgãos definiram padrões para níveis de fungos no ar em população não exposta, principalmente onde

a população permanece em ambientes fechados o ano todo em decorrência das condições climáticas. Em ambientes

climatizados, a OMS e o Conselho Nacional de Pesquisas Canadense (National Research Council Canada - NRCC) consideram aceitáveis concentrações de fungos de até 50 UFC/m³ de ar (WHO, 1988; CHARLES et al, 2005). O NRCC estabelece que tal concentração deva ser aceita desde que corresponda primariamente a *Ladosporium* ou outros fungos anemófilos comuns e também deve ser considerado que concentrações maiores do que 50 UFC/m³ de uma única espécie acarretem uma investigação imediata e níveis até 150 UFC/m³ devem ser considerados aceitáveis se corresponderem a uma mistura de espécies (RAO; BURGE; CHANG, 1996; CHARLES et al., 2005; GONTIJO FILHO et al., 2000).

No Brasil, o Ministério da Saúde publicou a Portaria n.º 3.523 de 28 de agosto de 1998, contendo Regulamento Técnico que visa “promover o estabelecimento de medidas referentes à limpeza dos sistemas de climatização e medidas específicas de padrões da qualidade do ar”. Contudo, esse regulamento causou muita discussão e discordância entre os membros do grupo técnico e sem conclusões consensuais sobre VMR (BRASIL, 1998; GIODA e NETTO, 2003).

As principais resoluções partiram da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que publicou, a partir dessa portaria governamental, a Resolução RE n.º 176 de 24 de outubro de 2000 com algumas orientações técnicas sobre “Padrões Referenciais da Qualidade do Ar de Interiores em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo”. Tal Resolução foi pioneira nessa área porque foram definidas as principais fontes de contaminação biológica de ar de interiores (bactérias, fungos, protozoários, vírus, algas pólen e artrópodes). Também foi definido em termos de contaminação biológica o VMR para contaminação microbiológica de fungos, a qual deve ser menor do que 750 UFC/m³, sendo inaceitável a presença de fungos patogênicos (QUADROS et al., 2009). Segundo Nunes (2005), esse limite foi alvo de críticas em relação à sua origem sem base científica já que foi obtido a partir da quantidade de esporos inalados de *Penicillium* sp, capaz de induzir um surto asmático quando inalado em 7 x 10⁵/10 m³ de ar por um indivíduo adulto sem estudos e critérios científicos que o correlacionem a potenciais efeitos a saúde humana. Além disso, também foi estabelecida nessa Resolução a relação I/E a qual deve ser menor ou igual a 1,5, em que I é a quantidade de fungos no ambiente interior e E é a quantidade de fungos no ambiente exterior. Também são determinados nessa Resolução valores de umidade relativa do ar, temperatura e contaminação química (BRASIL, 2000).

A Resolução RE n.º 176/90 foi atualizada para a Resolução RE n.º 9, de 16 de janeiro de 2003 que está em vigor atualmente, sem alterações nos valores para contaminantes biológicos (BRASIL, 2003a; GIODA e NETTO, 2003). Esta Resolução apresentou o número mínimo de pontos de amostragem em função do espaço físico, o que gerou grande número de críticas em função do número reduzido de pontos exigidos por metro quadrado, por exemplo, em uma área de até 1.000 m² deve-se coletar apenas 1(um) ponto amostral (NUNES et al., 2005).

Existem ressalvas não contempladas na Resolução RE n.º 09/03 que foram incluídas na consulta pública n.º 109, de 11 de dezembro de 2003, a qual foi encerrada sem um consenso por parte dos pesquisadores e sociedade. Essa consulta intitulada “Orientação Técnica referente aos indicadores de qualidade do ar interior em ambientes de serviços de saúde” seria uma proposta para atualizar parâmetros biológicos, químicos e físicos, identificação das possíveis fontes poluentes e métodos analíticos. A proposta também reconhecia a falta de uniformidade de instalações de sistemas de climatização em serviços de saúde no Brasil por sua extensão territorial e diferenças econômicas e tecnológicas. Outro ponto a ser destacado é a delimitação de áreas de risco de ocorrência de infecções, classificadas em nível 0 (zero) (área onde o risco não excede àquele encontrado em ambientes de uso público e coletivo); nível 1 (área onde não foi constatado o risco relacionado a efeitos adversos, porém algumas autoridades, organizações ou investigadores sugerem que o risco deva ser considerado); nível 2 (área onde existem fortes evidências de risco de ocorrência de eventos adversos relacionados à qualidade do ar de seus ocupantes ou de pacientes que utilizarão produtos manipulados nestas áreas, baseadas em estudos experimentais, clínicos ou epidemiológicos bem delineados); e nível 3 (área onde existem fortes evidências de alto risco de eventos adversos de seus ocupantes ou de pacientes que utilizam produtos manipulados nestas áreas, baseados em estudos experimentais, clínicos ou epidemiológicos bem delineados). De acordo com esses níveis, foram estabelecidas contagens máximas de UFC cujo indicador de qualidade de ar ambiental interior é a contagem total de bactérias e fungos: a. nível zero ≤ 750 UFC/m³; nível 1 = 500 UFC/m³, nível 2 = 200 UFC/m³ e nível 3 = 50 UFC/m³. Esses valores foram baseados na norma da ABNT NBR 7256 sobre o tratamento de ar em estabelecimentos assistenciais de saúde (EAS) e consequentemente nos tipos de filtros estabelecidos na norma (BRA-

SIL, 2003b; PEREIRA et al., 2005). Apesar da necessidade de manutenção rigorosa do sistema de ar condicionado em clínicas e hospitais, essa consulta deveria ser adaptada à realidade dessas unidades de forma que um número maior desses estabelecimentos pudesse ser contemplado. Uma nova discussão sobre uma legislação específica para os serviços de saúde demonstraria a necessidade do estabelecimento de parâmetros para ambientes hospitalares, que deveriam ser enquadrados em uma categoria especial para a qualidade do ar de interiores pela importância da participação do meio ambiente na transmissão de processos infecciosos em função de usuários mais susceptíveis.

4 Estudos científicos na adoção de valores limites para bioaerossóis

A necessidade de um maior número de estudos para o estabelecimento de valores limites para bioaerossóis, tanto em exposições ocupacionais quanto da população em geral, fez com que desde a década de 1980 surgissem propostas a partir de análises em diversos tipos de ambientes. Para ambientes considerados especiais ou críticos, como os serviços de saúde, foram padronizados limites máximos de UFC por amostragem passiva. Esses limites foram classificados em ótimos, aceitáveis e inaceitáveis para: i) enfermarias (0 a 450; 451 a 750 e acima de 750 UFC/dm²/h); ii) farmácia (0 a 100; 101 a 180 e acima de 180 UFC/dm²/h); iii) sala asséptica (0 a 50; 51 a 90 e acima de 90 UFC/dm²/h); iv) sala cirúrgica em repouso (0 a 4; 5 a 8 e acima de 8); e v) sala cirúrgica em atividade (0 a 60; 61 a 90 e acima de 90 UFC/dm²/h). Esse trabalho foi usado como base por Pasquarella et al. (2000) para estabelecer por meio de um modelo matemático, valores limítrofes de acordo com o risco ambiental para áreas hospitalares com o uso do Índice de Contaminação Aérea Microbiana (*Index of Microbial Air contamination* - IMA), calculado pela contagem das unidades formadoras de colônia. Segundo os mesmos autores, o risco pode ser classificado como: muito alto IMA até 5 UFC/h (salas ultralimpas, isolamento reverso, sala cirúrgica para prótese articular, sala para produção de soluções injetáveis); alto IMA até 25 UFC/h (salas limpas, centro cirúrgico, UTI, unidade de diálise); médio IMA até 50 UFC/h (enfermarias); e baixo IMA até 75 UFC/h (demais setores) (QUADROS et al., 2009).

Dacarro et al. (2003) estabeleceram um índice global de contaminação microbiana por metro cúbico de ar (*Global Index of Microbial Contamination* - GIMC/m³)

de 1.000 GIMC/m³ após avaliação da qualidade do ar em edifícios com base nos resultados obtidos a partir de 226 escritórios. Esse índice, considerado um valor limite saudável para QAI em edifícios públicos, tem sido criticado por alguns autores que encontraram em 95,5% dos escritórios avaliados, valores de GIMC/m³ abaixo desse índice (BERNASCONI et al., 2010).

Uma importante proposta foi apresentada por Górný e Dutkiewicz (2002), na qual foram estabelecidos valores de OEL em ambientes industriais e valores limites residenciais (*Residential Limit Values* - RLV) em edifícios. Esses índices foram determinados para componentes de bioaerossóis mediante várias medidas de frações inaláveis por métodos de impactação para a quantificação de fungos e bactérias e o teste de LAL para endotoxinas. Para os RLV de bactérias mesofílicas totais e fungos, foi proposto o valor de 5×10^3 UFC/m³ e, para endotoxinas, 50 UE/m³. Para os ambientes industriais contaminados por poeira orgânica, foram determinados os valores de 100×10^3 UFC/m³ para bactérias mesofílicas totais, 50×10^3 UFC/m³, para fungos, 20×10^3 UFC/m³, para bactérias Gram- negativas e actinomicetos termofílicos e 2.000 UE/m³ para endotoxinas. Além disso, foi destacada a presença no ar interior de *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis*, *Coxiella burnetii*, microrganismos estabelecidos pela Diretiva 2000/54/CE da Comunidade Europeia como de risco 3 e 4, e, portanto, independentemente da concentração, devem sempre ser inadmissíveis e resultar em ações preventivas (BRASIL, 2000).

Em outro estudo, Bouillard et al. (2005) apresentaram resultados de contaminação em edifícios públicos comparando o método de contaminação bacteriana coletada por amostragem ativa ($428-2,511$ CFU/m³) e os níveis de endotoxina na poeira pelo LAL (4,6-116,2 UE/mg). Os mesmos autores comparam seus dados a estudos anteriores, mas só para ambientes domésticos onde foram encontradas concentrações médias de 17,8 UE/mg na poeira de colchões e 18,6 UE/mg de pó de pisos e discute a falta de valores de OEL e TLV para avaliar o ambiente onde esses profissionais estão expostos. Em outro estudo, foi relatada uma média geométrica de 79,0 UE/mg em poeira residencial localizada em Boston, nos Estados Unidos.

Bernasconi et al. (2010) utilizaram o Teste de Ativação de Monócitos para avaliar salas de edifícios públicos comparando com a concentração no ar de fungos e bactérias por métodos microbiológicos clássicos. Os níveis de contaminantes em 95% dos escritórios não excederam 150

UEE/m³. Entretanto, os autores ressaltam que não há dados disponíveis a partir de locais de medição comparáveis, porque essa metodologia só foi aplicada para investigar a atividade dos bioaerossóis em criadouros de aves (7,5 x 10³ UEE/m³ a 3,8 x 10⁵ UEE/m³) e em estábulos (0,1 a 16 x 10⁶ UEE/m³) (KINDINGER et al., 2009; BERNASCONI et al., 2010). Apesar de os autores concluírem que a capacidade inflamatória foi muito menor nos escritórios do que na criação de animais, faltam estudos que comprovem qual nível de contaminação pode ser relacionada a agravos à saúde, além de estudos em outros tipos de ambientes (BERNASCONI et al., 2010).

5 Considerações finais

Para garantir a confiabilidade dos métodos de medição a bioaerossol, torna-se necessário unificar a metodologia, recomendando em primeiro lugar o uso de métodos quantitativos que devem permitir a avaliação de todos os tipos de contaminantes biológicos. As limitações da Resolução RE nº9/2003 indicam a necessidade de uma nova legislação principalmente para serviços de saúde incluindo uma discussão sobre a aplicabilidade dos testes in vitro, assim como a necessidade de estudos com enfoque epidemiológico que contribuiriam para a revisão e estabelecimento de novos VMR.

Agradecimentos

PAPES/FIOCRUZ pelo apoio financeiro.

Referências

AMERICAN CONFERENCE OF INDUSTRIAL HYGIENISTS. Step two: On-site investigation, p. 1-8; Fungi, p. 1-10; Bacteria, p. 1-7. Committee on Bioaerosols. In: **Guidelines for the assessment of bioaerosols in the indoor environment**, 1989.

BERNASCONI, C. et al. D. Pyrogenic activity of air to characterize bioaerosol exposure in public buildings: a pilot study. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 50, n. 6, p. 571-577, jun. 2010. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02831.x

BLAAUBOER, B.J. The contribution of in vitro toxicity data in hazard and risk assessment: current limitations and future perspectives. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 180, n. 2, p. 81-84, aug. 2008. doi: 10.1016/j.toxlet.2008.05.008

BONETTA, S. et al. Assessment of microbiological indoor air quality in an Italian office building equipped with an HVAC system. **Environmental Monitoring and Assessment**, Netherlands, v.16, n. 1-4, p. 473-83, Feb. 2010. doi: 10.1007/s10661-009-0761-8

BOUILLARD, L. et al. Bacterial contamination of indoor air, surfaces, and settled dust and related dust endotoxin concentrations in healthy office buildings. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Poland, v. 12, n. 2, p. 187-192, jul./dec. 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 176, de 24 de outubro de 2000. Orientação Técnica sobre os Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 25 out. 2000. Seção 1, n. 25-10, p. 32-33.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 09, de 16 de Janeiro de 2003. Orientação Técnica sobre Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior, em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 10 jan. 2003a. Seção 1, n. p. 45-53, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública nº 109, de 11 de dezembro de 2003. Proposta de resolução que dispõe sobre Indicadores da qualidade do ar ambiental interior em serviços de saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 12 dez., 2003b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério Público. Portaria nº 3.523 de 28 de agosto de 1998. Regulamento Técnico. Qualidade do Ar (Sistemas de Climatização). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Brasília, 31 ago. Seção 1, p. 40-42, 1998.

BRICKUS, L. S. R.; AQUINO NETO, F. R. A qualidade do ar de interiores e a química. **Química Nova**, São Paulo, v. 1, n. 22, p. 65-74, jan./fev.1999. doi: 10.1590/S0100-40421999000100013

CASTRO, H. A.; TAMBELLINI, A.T.; NETTO, A. R.; DA SILVA, J. J. O. Study of the interleukin 1 and 6 and tumorous necrosis factors in workers exposed to silica. **Cadernos de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 4, p. 785-798, out./dez. 2005.

CHARLES, K. et al. **Indoor Air Quality Guidelines and Standards**. National Research Council Canada, NRCC RR-204, 2005. Disponível em: <<http://www.nrc-cnrc.gc.ca/obj/irc/doc/pubs/rr/rr204/rr204.pdf>>. Acesso em: 6 jul. 2011.

- DACARRO, C. et al. Determination of aerial microbiological contamination in scholastic sports environments. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 5, p. 904-912, nov. 2003. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02044.x
- DANESHIAN, M.; Von AULOCK; HARTUNG, T. Assessment of pyrogenic contaminations with validated human whole-blood assay. **Nature Protocols**, London, v. 4, n. 12, p. 1709-1721, dec. 2009. doi: 10.1038/nprot.2009.159
- DASCALAKI, E.G. Indoor environmental quality in hellenic hospital operating rooms. **Energy and Buildings**, Belgrade, v. 41, n. 5, p. 551-560, may 2009. doi: 10.1016/j.enbuild.2008.11.023
- DUTKIEWICZ, J. Bacteria and fungi in organic dust as potential health hazard. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Poland, v. 4, n. 1, p. 11-16, jan./jun.1997.
- GONTIJO FILHO, Paulo Pinto; SILVA, C. R. M; KRITSKI, A. L. Ambientes climatizados. Portaria 3.523 de 28/8/98 do Ministério da Saúde e padrões de qualidade do ar de interiores. **Jornal de Pneumologia**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 254-58, sep./oct. 2000. doi: 10.1590/S0102-35862000000500006
- FLEISCHER, M. et al. Microbiological control of airborne contamination in hospitals. **Indoor and Built Environment**, United Kingdom, v. 15, n. 1, p. 53-56, feb. 2006. doi: 10.1177/1420326X06062230
- GIODA, A.; AQUINO NETO, F.R. Poluição química relacionada ao ar de interiores no Brasil. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 359-365, may/jun. 2003. doi: 10.1590/S0100-40422003000300013
- GÓRNY,R.L.; DUTKIEWICZ, J. Bacterial and fungal aerosols in indoor environment in central and eastern European countries. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Poland, v. 9, n. 1, p. 17-23, jan./jun. 2002.
- KINDINGER, I. et al. A new method to measure air-borne pyrogens based on human whole blood cytokine response. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 298, n. 1-2, p.143-153, mar. 2005. doi: 10.1016/j.jim.2005.01.006
- LIEBERS, V. et al. Standardization of whole blood assay for determination of pyrogenic activity inorganic dust samples. **International Journal of Hygiene Environmental Health**, Germany, v. 212, n. 5, p. 547-556, sep. 2009. doi:10.1016/j.ijheh.2009.03.003
- NUNES, Z.G. et al. Indoor air microbiological evaluation of offices, hospitals, industries, and shopping centers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 4, p. 351-357, jan./jul. 2005. doi: 10.1590/S0074-02762005000400003
- ORTIZ, G. et al. A Study of air microbe levels in different areas of an hospital. **Current Microbiology**, New York, n. 59, n. 1, p. 53-58, jul. 2009. doi: 10.1007/s00284-009-9398-7
- PANTOJA, L.D.M.; COUTO, M.S.; PAIXÃO, G.C. Diversidade de Bioaerossóis Presentes em Ambientes Urbanizados e Preservados de um Campus Universitário. **Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 41-47, jan./jun., 2007.
- PASQUARELLA, C.; PITZURRA, O.; SAVINO, A. The index of microbial air contamination. **The Journal of Hospital Infection**, London, v. 46, n. 4, p. 241-256, dec. 2000. doi: 10.1053/jhin.2000.0820
- PEREIRA, R.G. et al. Bioaerossóis bacterianos em um hospital. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 26, n. 1, p. 77-81, jan./mar. 2005.
- QUADROS, M.E. et al. Indoor air quality in hospitals: a case study and a critical review of current standards. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 3, p. 431-438, jul./set. 2009. doi: 10.1590/S1413-41522009000300017
- RAO, C. Y.; BURGE, H. A.; CHANG, J. C. S. Review of quantitative standards and guidelines for fungi in indoor air. **Journal of the Air & Waste Management Association**, Pittsburgh, v. 46, n. 9, p. 899-908, sep. 1996.
- RIEHELMANN, H. et al. Differential response of Mono Mac 6, Beas-2B, and Jurkat cells to indoor dust. **Environmental Health Perspectives**, North Carolina, v. 115, n. 9, p. 1325-1332, Set. 2007. doi: 10.1289/ehp.9874
- ROOS, C. et al. Studies on fungal and bacterial population of air-conditioned environments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 47, p. 827-835, set. 2004. doi: 10.1590/S1516-89132004000500020
- SCHINDLER, S. et al. International validation of pyrogen tests based on cryopreserved human primary blood cells. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 316, n. 1-2, p. 42-51, oct. 2006. doi:10.1016/j.jim.2006.07.023
- SCHINDLER, S. et al. Development, validation and applications of the Monocyte Activation Test for pyrogens based on human whole blood. **ALTEX**, Germany, v. 26, n. 4, p. 265-277, oct./dec. 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Programmes and projects: Guidelines for indoor air quality: dampness and mould**, 2009. Disponível em: <http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0017/43325/E92645.pdf>. Acesso em: 6 jul. 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Indoor air quality: biological contaminants**. European Series, n. 31, Copenhagen, Denmark, 1988.