**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM**

ALDA GRACIELE CLAUDIO DOS SANTOS ALMEIDA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO AR NO CENTRO DE MATERIAL
E ESTERILIZAÇÃO: AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA PRESSÃO
NEGATIVA NA ÁREA DA LIMPEZA**

**SÃO PAULO
2018**

ALDA GRACIELE CLAUDIO DOS SANTOS ALMEIDA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO AR NO CENTRO DE MATERIAL
E ESTERILIZAÇÃO: AVALIAÇÃO DO IMPACTO DA PRESSÃO
NEGATIVA NA ÁREA DA LIMPEZA**

Versão corrigida da tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem na Saúde do Adulto (PROESA) da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Enfermagem na Saúde do Adulto

Orientadora: Profª Drª Kazuko Uchikawa Graziano

VERSÃO CORRIGIDA

A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo.

**SÃO PAULO
2018**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Assinatura:_____.

Data: __/__/__

Catálogo na Publicação (CIP)

Biblioteca Wanda de Aguiar Horta”

Almeida, Alda Graciele Claudio dos Santos

Qualidade microbiológica do ar no centro de material e esterilização: avaliação do impacto da pressão negativa na área da limpeza / Alda Graciele Claudio dos Santos Almeida. São Paulo, 2018.

100 p.

Tese (Doutorado) – Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Kazuko Uchikawa Graziano

Área de concentração: Enfermagem na Saúde do Adulto

1. Aerossol. 2. Qualidade do ar. 3. Esterilização.

Nome: Alda Graciele Claudio dos Santos Almeida

Título: Qualidade microbiológica do ar no centro de material e esterilização: avaliação do impacto da pressão negativa na área da limpeza

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem na Saúde do Adulto (PROESA) da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dra. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aqueles que são minha fonte de inspiração, força e apoio, minha amada família!

Aos meus amados pais, Maria do Socorro de Almeida e Juarez Claudio dos Santos (em memória), pelos valiosos ensinamentos de vida e amor, por priorizarem a educação na formação dos seus filhos. Ao meu querido painho, minha eterna saudade, dedico, em especial, por ter ensinado a lutar pelos sonhos com garra e determinação, assim como ele lutou pela vida. À minha mainha, minha devoção e imenso amor, a grandeza de seu coração, sua garra, humildade e companheirismo é o que me fortalece para as batalhas dessa vida e a inspiração na busca de ser melhor a cada novo dia.

Aos meus irmãos, Alexandro, Allan e Alciele, pelo companheirismo, união, apoio incondicional e cumplicidade. Por estarem sempre presentes no meu caminhar e impulsionarem o seguir lutando e sonhando, sem desistir.

Aos meus sobrinhos, Filipe e Maitê, por serem fontes de energia e alegria em nossas vidas.

AGRADECIMENTOS

Ao Grandioso Deus, Jesus e Nossa Senhora Aparecida por guiar os meus passos, pela proteção, força espiritual e amor.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Kazuko Uchikawa Graziano, pelos valiosos ensinamentos científicos, por instigar-me a buscar sempre o rigor metodológico e por acolher essa alagoana, oportunizando o desenvolvimento profissional.

A todos colegas do grupo de pesquisa que fizeram parte desse ciclo de formação, pelas valiosas discussões. Em especial, Caroline Lopes Ciofi Silva, Camila Quartim de Moraes Bruna, Jeane Aparecida Gonzales Bronzatti, Paulo Roberto Laranjeira, Ana Tercia Barijan, Wagner de Aguiar Junior, Elaine Ferreira Lasaponari e Rafael Queiroz de Souza.

Ao Hospital Israelita Albert Einstein, pela autorização para realização da coleta de dados. Em especial, a Dra Giovana Abrahao de Araujo Moriya, Izabel Iamaguti, Thiago Deivid da Silva e todos os profissionais atuantes nos CME que colaboraram gentilmente para que a coleta de dados fosse possível.

Ao Prof. Dr. Valderez Gambale pela colaboração essencial para execução dessa pesquisa, concedendo o empréstimo do amostrador de ar.

À Dra Lycia Mimica, Dra Alessandra Navarini e Suzeth Matiko Sasasgawa, do Laboratório da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa, pela colaboração nas identificações microbiológicas.

Aos meus grandes amigos, que foram peças fundamentais para tornarem minha vida em São Paulo mais leve e aos bolsistas da EEUSP, que juntos encontramos força para superar os obstáculos diários. Em especial, Luciane Simões Duarte, Ramon Oliveira, Osmara Alves dos Santos, Christiane B. N. Chofakian, Vinicius Gomes, Marielle de Moraes e Tatiane Tavares. MUITÍSSIMO obrigada pelo acolhimento, afeto, apoio e companheirismo.

Aos meus queridos amigos colombianos, que foram nos últimos anos como uma família. Em especial, Alexander Zuleta Durango, Carlos Cardona, Lina Maria Osorio, Andres, Duberney Hincapie, Sebastián, Cristian Andres. Obrigada por me permitirem vivenciar outra cultura, pela leveza dos tantos momentos compartilhados e pelas risadas revigorantes, por tornarem os meus dias bem mais alegres.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo e pelo apoio no financiamento do material para coleta de dados com uso da verba PROEX-CAPES chamada interna 2017.01.

Ao Programa de Pós-Graduação em Enfermagem na Saúde do Adulto (PROESA) pela formação acadêmica.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste sonho.

"E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria."

1 Coríntios 13:2

Almeida, AGCS. Qualidade microbiológica do ar no Centro de Material e Esterilização: avaliação do impacto da pressão negativa na área da limpeza [tese]. São Paulo: Escola de Enfermagem, Universidade de São Paulo; 2018.

RESUMO

Introdução: Recomendações nacionais (RDC ANVISA 15/2012; 50/2002) e internacionais determinam que as áreas destinadas à limpeza dos produtos para saúde (PPS) no Centro de Material e Esterilização (CME) mantenham um diferencial de pressão negativo do ar ambiente (BRASIL, 2012; AAMI, 2006; ASHARE, 2013). Entretanto, essa recomendação, até o momento, não está sustentada por estudos de alto rigor científico. Embora não houvessem justificativas explicitadas para tal recomendação, presume-se que seja prioritariamente pelo risco de transferência aérea de microrganismos, da área de limpeza para as áreas adjacentes, configurando-se em risco ocupacional. **Objetivo:** Avaliar o impacto da presença da pressão negativa na área de limpeza do CME mediante a avaliação da qualidade microbiológica do ar desse setor e da área de preparo dos PPS. **Método:** Foram comparadas amostras microbiológicas do ar coletadas da sala de limpeza (área suja) e da sala de preparo (área limpa) de dois CME classe II de um mesmo hospital localizado na cidade de São Paulo: com e sem sistema de pressão negativa do ar na área de limpeza, este último com sistema de condicionamento do ar centralizado. Como controle, foram realizadas coletas do ar exterior ao hospital. Para obter amostras microbiológicas, foi utilizado o amostrador air six-stage Andersen™, com os seguintes meios de cultura seletivos e não seletivo: agar sangue, agar sabouraud, Lowenstein jensen e agar legionella. Durante a coleta do ar, foram verificadas as seguintes variáveis: temperatura e a umidade relativa dos ambientes, número de pessoas presentes e equipamentos sendo utilizados na limpeza. Após as coletas, as amostras foram encaminhadas ao laboratório de ensaios microbiológicos da escola de enfermagem da Universidade de São Paulo, onde permaneceram em estufa microbiológica regulada a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os dias de incubação foram específicos para recuperação pretendida de cada grupo microbiano quais sejam: bactérias vegetativas - incluindo *Legionella*, *Mycobacterium tuberculosis* e fungos. As placas com crescimento positivo foram submetidas a identificação do gênero e/ou espécie, por meio das características fenotípicas e reações específicas, pelo laboratório de

microbiologia da Santa Casa de São Paulo. As amostras, tanto do CME com pressão negativa como naquele sem, foram coletas em quintuplicata. **Resultados:** a concentração de bioaerossóis na área da limpeza no CME sem pressão negativa e da área de preparo foi de 273,15 e 206,71 UFC/m³ respectivamente, enquanto, no CME com pressão negativa foi de 116,96 UFC/m³ na sala da limpeza e 131,10 na de preparo. Comparando a quantidade média de colônias isoladas dos CME estudados, a diferença foi significativamente menor ($p=0,01541$) no CME com pressão negativa. A relação I/E, onde I é a quantidade de fungos no ambiente interior e a quantidade de fungos no ambiente exterior, no CME com pressão negativa, na sala de limpeza foi de 0,5 e na sala de preparo de 0,58. No CME sem pressão negativa, a relação foi de 0,8 e 0,6, respectivamente, na sala de limpeza e preparo, ambos abaixo do padrão de referência, que deve ser $\leq 1,5$, atualmente estabelecido pela resolução nº 9/2003 da ANVISA que dispõe sobre referenciais de qualidade do ar interior, em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo. Em nenhum dos CME foram recuperados *Mycobacterium tuberculosis* ou *Legionella* do ar. Os microrganismos identificados foram *Penicillium spp*, *Aspergillus niger*, *Rhodotorula spp.*, *Bacillus subtilis*, e *Micrococcus spp.*, todos considerados como não apresentando riscos à saúde em imunocompetentes. **Conclusão:** Os achados da presente investigação evidenciaram que o sistema de pressão negativa na sala de limpeza do CME contribuiu para redução quantitativa de bioaerossóis, tanto nesse ambiente como na sala de preparo. Entretanto, mesmo no CME sem esse sistema de tratamento do ar na sala de limpeza, a concentração de bioaerossóis foi menos da metade do padrão referencial estabelecido pela resolução nº 9/2003 da ANVISA, em que o valor máximo permitido deve ser ≤ 750 UFC/m³ de fungos. Ressalta-se que a quantidade e tipo de microrganismos existentes em qualquer ar ambiente é circunstancial, instável e principalmente dependente dos disseminadores microbianos presentes no local, sejam pessoas ou atividades. Nesse sentido, não se condena conclusivamente CME que não dispõe de pressão negativa na sala de limpeza configurando risco ocupacional.

Palavras-chave: Aerossóis. Controle de qualidade do ar. Pressão negativa. Centro de Material e Esterilização. Enfermagem.

Almeida, AGCS. Microbiological quality of air in the Material and Sterilization Center: evaluation of the impact of negative pressure in the cleaning area [thesis]. São Paulo: School of Nursing, University of São Paulo; 2018.

ABSTRACT

Introduction: National (RDC ANVISA 15/2012) and international guidelines recommend that areas for cleaning medical devices in the Material and Sterilization Center maintain a negative differential ambient air pressure (BRAZIL, 2012; AAMI, 2006; ASHARE, 2013). However, this recommendation, so far, has not been supported by highly scientifically rigorous studies. Although there are no explicit justifications for such recommendations, it can be assumed that they are grounded on the risk of airborne microorganism contamination from the cleaning area to adjacent ones, which constitutes occupational risk. **Objective:** to evaluate the impact of negative air pressure on the microbiological quality of the air in the Material and Sterilization Center area where medical devices are cleaned and in the adjoining preparation room. **Methods:** Microbiological air samples were collected from the room where medical devices are cleaned (also called dirty room) and from the room where these devices are prepared (clean room) at two class II Material and Sterilization Center in the same hospital, located in the city of São Paulo: with and without a negative air pressure system in the cleaning room; the latter with central air conditioning. As a control, outdoor air samples were collected. To obtain microbiological air samples, Andersen six-stage air sampler was used, with the following selective and non-selective culture media: *blood agar*, *sabouraud agar*, Lowenstein Jensen and *agar legionella*. During air collection, the following variables were controlled: temperature and air relative humidity in the rooms, number of people present in the sites and equipment used for the cleaning. After the collection, the samples were sent to the Laboratory of Microbiological Trials of the Nursing School of the University of São Paulo, where they remained in a microbiological oven at a temperature of $35^{\circ}\text{C} \pm 2$. The incubation period was specific for the intended recovery of each microbial group: vegetative bacteria – including *Legionella* and *Mycobacterium tuberculosis* and *fungi*. Identification of microorganisms` genus and / or species was carried out according to their phenotypic characteristics at the Microbiology Laboratory of the Santa Casa Hospital in São Paulo. The samples, in both Material and Sterilization Center, the one with negative pressure

and the one without, were collected in a five-fold sample. **Results:** The concentration of bioaerosols in the cleaning room and preparation area without negative pressure was 273.15 and 206.71 UFC / m³, respectively, while in the Material and Sterilization Center with negative pressure the concentration of bioaerosols was 116.96 CFU / m³ in the cleaning room, and 131.10 in the preparation area. The number of isolated colonies in the negative pressure Material and Sterilization Center was significantly lower ($p = 0.01541$). The I / E ratio, where I is the amount of fungi in the indoor environment, and E is the amount of fungi in the outdoor environment, in the cleaning room of the negative pressure Material and Sterilization Center was 0.5, and in the preparation area, 0, 58; as for the Material and Sterilization Center without negative pressure, in the cleaning and in the preparation area, the ratio was 0.8 and 0.6, respectively, both below the reference standard currently established by ANVISA Resolution No. 9/2003, which determines indoor air quality standards at artificially climatized environments for public use. In neither of the studied Material and Sterilization Center were *Mycobacterium tuberculosis* or *Legionella* recovered from the air. The microorganisms identified were *Penicillium spp.*, *Aspergillus niger*, *Rhodotorula spp.*, *Bacillus subtilis*, and *Micrococcus spp.*, all of which are considered harmless to immunocompetent subjects. **Conclusion:** The findings showed that the negative pressure system in the Material and Sterilization Center cleaning room contributed to the quantitative reduction of bioaerosols, both in this area and in the adjoining preparation area. However, even in the Material and Sterilization Center whose cleaning room did not have this system the concentration of bioaerosols was less than half the reference standard established by ANVISA Resolution No. 9/2003. It should be stressed that the quantity and type of microorganisms in any ambient air is circumstantial, instable and, especially dependent on microbe disseminators in the site, whether they are people or activities. Therefore, it cannot be conclusively concluded that Material and Sterilization Center that do not have negative pressure in their cleaning rooms offer occupational risk.

Key words: aerosols, air quality control, negative pressure, material and sterilization center, nursing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES (FIGURAS, GRÁFICOS, QUADROS)

FIGURAS

Figura 1- Equipamento de vapor em alta pressão (Steamer®) em uso na limpeza de PPS.	56
Figura 2. Ilustração do dispositivo <i>Six-stage Andersen solid impaction sampler</i>	58
Figura 3. Esquema do método do estudo. São Paulo, 2018.	65

GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribuição comparativa da quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) isoladas nos meios de cultura agar sangue e agar sabouraud dos CME com e sem pressão negativa. São Paulo, 2018.	71
Gráfico 2. Distribuição comparativa entre o nível de contaminação do ar por quantidade de UFC recuperada nos meios de cultura agar sangue e agar sabouraud nas salas de limpeza e preparo dos CME avaliados. São Paulo, 2018.	72
Gráfico 3. Distribuição da quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas nos CME com e sem pressão negativa, segundo equipamentos que estavam em uso no momento da coleta do ar. São Paulo, 2018.	75
Gráfico 4. Distribuição das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nos CME com e sem pressão negativa segundo o número de funcionários presentes no momento das coletas de ar. São Paulo, 2018.	76

QUADROS

Quadro 1. Distribuição do número de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas por estágios do air six-stage Andersen sampler segundo os meios de cultura e os locais das coletas realizadas: no ambiente exterior ao hospital e nas salas de limpeza e preparo dos CME, com e sem pressão negativa. São Paulo, 2018.	68
Quadro 2. Microrganismos isolados nos Centros de Material e Esterilização com e sem pressão negativa e no ambiente exterior ao hospital. São Paulo, 2018.	77
Quadro 3. Distribuição da sedimentação dos microrganismos isolados nas salas de limpeza e preparo dos CME com e sem pressão negativa nos diferentes estágios do Andersen. São Paulo, 2018.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição da quantidade da média de Unidade Formadora de Colônia (UFC) segundo os estágios do <i>six-stage Andersen sampler</i> . São Paulo, 2018.	67
Tabela 2. Distribuição das medidas de tendência central das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) recuperadas segundo sala de limpeza e preparo dos CME estudados, com e sem pressão negativa, e ambiente exterior. São Paulo, 2018.	71
Tabela 3. Distribuição da estimativa do nível de contaminação do ar interior na sala de limpeza e preparo em comparação com o do exterior ao hospital. São Paulo, 2018.	72
Tabela 4 Distribuição do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) isoladas nos meios de cultura das amostras de ar no CME sem pressão negativa e no ambiente exterior por valores de temperatura e umidade relativa do ar. São Paulo, 2018.	73
Tabela 5. Distribuição do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) isoladas nos meios de cultura das amostras de ar no CME com pressão negativa e no ambiente exterior ao hospital por valores de temperatura e umidade relativa do ar. São Paulo, 2018.	74
Tabela 6. Distribuição das estimativas, erro padrão, valor de p e intervalos de confiança das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) isoladas nos meios de cultura nas salas de limpeza e preparo dos CME com e sem pressão negativa, segundo temperatura e umidade relativa do ar. São Paulo, 2018.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAMI	<i>Association for the Advancement of Medical Instrumentation</i>
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AIA	<i>American Institute of Architects</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASHRAE	<i>American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CME	Centro de Material e Esterilização
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSHA	<i>Occupational Safety & Health Administration</i>
PPS	Produtos para Saúde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SS	Serviços de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVO	25
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	27
3.1	CENTRO DE MATERIAL E ESTERILIZAÇÃO.....	27
3.2	CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL DURANTE O PROCESSO DE LIMPEZA DE PRODUTOS PARA SAÚDE	31
3.3	CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS EM AEROSSÓIS E SUAS IMPLICAÇÕES À SAÚDE	34
3.3.1	Aerossóis.....	34
3.3.2	Fungos.....	35
3.3.3	Bactérias.....	38
3.4	SISTEMA DE VENTILAÇÃO AMBIENTE E AS RECOMENDAÇÕES NACIONAIS E INTERNACIONAIS PARA ÁREA DE LIMPEZA DO CME.....	43
3.5	PADRÃO REFERENCIAL DE QUALIDADE DO AR INTERIOR	47
3.6	REFERENCIAL METODOLÓGICO.....	49
3.6.1	Equipamentos utilizados em coleta microbiológica do ar	49
3.6.2	Amostrador de ar <i>six-stage Andersen</i> e a tabela de conversão	50
4	MATERIAL E MÉTODO.....	55
4.1	TIPO DE ESTUDO	55
4.2	LOCAIS DO ESTUDO.....	55
4.3	DESCRIÇÃO DOS CME AVALIADOS NO ESTUDO.....	55
4.4	DESCRIÇÃO DO EQUIPAMENTO DE COLETA DE AR E OS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS	57
4.5	VALIDAÇÃO METODOLÓGICA	59
4.6	COLETA DE DADOS	60
4.7	IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS.....	62
4.8	AMOSTRAGEM	63
4.9	TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	64
4.10	ESQUEMA DA COLETA DOS DADOS DO ESTUDO	64
5	RESULTADOS	67
5.1	RESULTADOS DA VALIDAÇÃO	67
5.2	RESULTADOS DA COLETA DE DADOS	68

5.2.1	Resultados de UFC	68
5.2.2	Resultados microbiológicos	76
6	DISCUSSÃO.....	80
7	CONCLUSão	90
	REFERÊNCIAS.....	92
	APÊNDICE	99

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

O Centro de Material e Esterilização (CME) é uma unidade funcional que tem por missão transformar os produtos para saúde (PPS) sujos e contaminados em limpos, desinfetados ou esterilizados conforme a sua classificação de risco em ocasionar infecção. Os PPS após o processamento devem estar, portanto, seguros para um próximo uso, garantindo ausência de resíduos orgânicos, incluindo ausência de biofilmes, endotoxinas e proteínas priônicas. Adicionalmente, a integridade e a funcionalidade satisfatória dos PPS, até onde são possíveis de serem avaliadas, devem estar asseguradas. O CME presta apoio aos Serviços de Saúde (SS) responsáveis pela assistência direta ao paciente. É regulamentado pela Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº15, de 15 de março de 2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (BRASIL, 2012) que dispõe sobre requisitos de boas práticas para o processamento de produtos para saúde.

O CME é classificado em Classe I e II, sendo definido como CME Classe II aquele que realiza o processamento de produtos para a saúde não-críticos, semicríticos e críticos de conformação complexa e não complexa, passíveis de processamento. O CME Classe II deve possuir as seguintes áreas: sala de recepção e limpeza (setor sujo); sala de preparo e esterilização (setor limpo); sala de desinfecção química, quando aplicável (setor limpo); área de monitoramento do processo de esterilização (setor limpo); e sala de armazenamento e distribuição de materiais esterilizados - setor limpo (BRASIL, 2012).

Recomendações nacionais e internacionais determinam que as áreas destinadas à limpeza de PPS mantenham um diferencial de pressão negativo do ar ambiente (BRASIL, 2012; ABNT, 2005; AAMI, 2006; ASHRAE, 2013; AIA, 2001; CDC, 2017). A Organização Mundial da Saúde - OMS (OMS, 2014) define pressão negativa do ambiente como o diferencial de pressão de ar exercido em um local para impedir a passagem de ar deste para os espaços adjacentes, como corredores. A *Occupational Safety & Health Administration* (OSHA) dos Estados Unidos da América (EUA) não faz menção quanto ao uso de diferencial de pressão negativo na sala de limpeza do CME, apenas na sala de desinfecção química.

A RDC nº 15 da ANVISA (BRASIL, 2012) em seu artigo 52 recomenda que as áreas destinadas à limpeza de PPS tenham as seguintes condições: manter temperatura ambiente entre 18º e 22º C, garantir vazão mínima de ar total de 18,00

$\text{m}^3/\text{h}/\text{m}^2$, manter um diferencial de pressão negativo entre os ambientes adjacentes, com pressão diferencial mínima de 2,5 Pa e prover exaustão forçada de todo ar da sala com descarga para o exterior da edificação, com ar de reposição proveniente dos ambientes vizinhos. Entretanto, muitos CME do Brasil não conseguiram cumprir alguns itens desta exigência, especialmente “manter um diferencial de pressão negativo entre os ambientes adjacentes” e “exaustão forçada de todo ar da sala com descarga para o exterior da edificação, com ar de reposição proveniente dos ambientes vizinhos”.

Tal recomendação da RDC nº 15 da ANVISA (BRASIL, 2012) para as áreas destinadas à limpeza de PPS é questionável a começar pela falta de consenso no número de trocas de ar por hora. A *American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers* (ASHRAE, 2013), estabelece que devam ser realizada no mínimo duas trocas de ar por hora e o total de seis trocas de ar por hora. A *Association for the Advancement of Medical Instrumentation* (AAMI, 2006), estabelece, apenas, a quantidade mínima de trocas de ar por hora, devendo ser 10, mantendo a temperatura da sala entre 16 a 18°C e a umidade relativa do ar, de 30% a 60%. O *American Institute of Architects* (AIA, 2001), não estabelece a quantidade mínima, apenas considera que o total de trocas de ar por hora deve ser seis, mantendo a temperatura entre 20 a 23°C, não definindo a umidade relativa. O *Centers for Disease Control and Prevention* - EUA (CDC, 2017), usa como recomendação os mesmos parâmetros propostos pela AIA (2001). A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), na Norma Brasileira – NBR 7256:2005 (ABNT, 2005) também recomenda a pressão negativa e indica o parâmetro de 18 $\text{m}^3/\text{h}/\text{m}^2$ para vazão mínima de ar exterior, o que corresponde a 6 trocas de ar por hora, quanto à umidade relativa do ar e a temperatura não há recomendação.

A necessidade de manter um diferencial de pressão negativo do ar na sala de limpeza do CME conforme o artigo 52 da RDC nº15 da ANVISA (BRASIL, 2012) e recomendações internacionais até o momento, não está sustentada por evidências científicas robustas. O que é motivo de questionamento é um regulamento governamental estabelecer uma obrigatoriedade, que deve ser cumprida por todos os hospitais do país com CME Classe II, sem ter comprovação da eficácia ou dos riscos de não se ter esse sistema no setor. O sistema de pressão negativa demanda custos para a sua instalação no CME do hospital, muitas vezes exigindo reformas estruturais para conseguir prover exaustão forçada de todo ar da sala de limpeza com descarga

para o exterior da edificação, e ainda os custos com a manutenção do sistema. Adicionalmente, sendo a área da limpeza de um CME, uma área de constante transferência de PPS, tanto vindos das unidades assistenciais para processamento através de balcões e portas quanto de saídas para a área de preparo, na maioria sem antecâmara, é questionável a manutenção da pressão negativa para os CME que investem nessa tecnologia construtiva de infraestrutura.

Ao se pensar no risco do serviço que não dispõe de pressão negativa na sala da limpeza, pode-se hipotetizar uma relação dessa determinação com o risco na segurança ocupacional dos profissionais que trabalham neste setor e nas áreas adjacentes a sala de limpeza do CME. É improcedente pensar em risco de recontaminação dos PPS já limpos na área do preparo por contaminação aérea, considerando que esses PPS ainda serão esterilizados. Também não procede a justificativa do risco químico ocupacional para os profissionais que trabalham em áreas adjacentes a da limpeza, uma vez que os produtos químicos comumente utilizados na sala de limpeza são os detergentes.

Dessa forma, considerando como risco a segurança ocupacional dos profissionais atuantes no CME que não dispõe de sistema de pressão negativa na área da limpeza, entra-se na discussão de outro ponto crítico e mais uma regulamentação questionável, em vigor desde 16 de janeiro de 2003, a Resolução RE nº 9 da ANVISA (BRASIL, 2003). Essa resolução dispõe sobre padrões referenciais de qualidade do ar interior em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo, estabelecendo o limite aceitável de contaminação microbiológica do ar apenas para fungos, em que o valor máximo recomendável deve ser ≤ 750 UFC/m³ de fungos. Esse parâmetro arbitrado pela legislação é bastante controverso, uma vez que não existem evidências que vinculem os coeficientes de esporos fúngicos a um nível seguro de exposição.

A OMS, no documento *WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould* (WHO, 2009), afirma que os poluentes microbianos do ar interior de relevância para a saúde são amplamente heterogêneos. Estes podem variar de esporos e pólen de plantas provenientes do ambiente exterior, a bactérias, fungos, vírus, entre outros. Como as pessoas são expostas frequentemente a múltiplos agentes biológicos e químicos simultaneamente, torna-se complexo estimar com precisão espécies individuais de microrganismos e outros agentes biológicos que são responsáveis pelos efeitos sobre a saúde, sendo quase inviável identificá-los. Apesar da dificuldade

de determinar conclusivamente os agentes causadores de efeitos adversos à saúde, a OMS afirma que um nível excessivo de qualquer um desses agentes no ambiente torna-se um risco potencial à saúde, entretanto, não determina a quantidade que considera como excessiva. É posto que o crescimento microbiano num ambiente pode resultar em uma quantidade maior de esporos fúngicos, alérgenos, endotoxinas, micotoxinas, compostos orgânicos voláteis, fragmentos de células, entre outros (WHO, 2009).

Diante da falta de padrões referenciais capazes de relacionar níveis seguros de contaminação aérea por microrganismos, não havendo evidências dos riscos à saúde ocupacional, voltam-se os questionamentos de quais os motivos para que seja imposta pontualmente a necessidade de um sistema de pressão negativa na sala de limpeza do CME.

Há indícios de que alguns equipamentos utilizados no processo de limpeza dos PPS possam estar vinculados a geração de gotículas e aerossóis nesse ambiente, mas o quanto estes podem contaminar o ambiente dentro do CME, não se sabe. Estudos realizados em décadas anteriores demonstraram que aerossóis são gerados durante as atividades de limpeza manual, uso de dispositivos com água altamente pressurizada e decorrente do funcionamento das lavadoras ultrassônicas (BRAYMEN, 1969; TURNER, 1975; O'TOOLE, 2009).

O risco quanto à formação de aerossóis baseia-se no fato destes poderem se dispersar no ambiente e permanecerem suspensos no ar e serem inalados por indivíduos susceptíveis, mesmo que não haja contato próximo com a fonte eliminadora. Já as gotículas geradas durante os processos de limpeza em CME, contendo ou não um agente infeccioso, podem se depositar em superfícies por ação da gravidade, contribuindo para a transferência de microrganismos quando essas são tocadas pelas mãos dos profissionais (ANVISA, 2000; SIEGEL et al., 2007). O quanto ter ou não o sistema de pressão negativa poderia influenciar na concentração desses bioaerossóis, até então não se tem conhecimento.

Embora a RDC nº15 da ANVISA (BRASIL, 2012) determine a exigência da sala de limpeza com um diferencial de pressão negativo do ar ambiente, não há recomendação explícita de uso de máscara N95. No art. 31, § 3º dessa Resolução, afirma que quando não estiver especificado, o equipamento de proteção deve ser compatível com o risco inerente à atividade, entretanto § 2º desse mesmo art.31, é posto que “na sala de recepção e limpeza, o protetor facial pode substituir o uso de

máscara e óculos”. De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2009), a máscara N95 é um equipamento de proteção respiratória com eficiência de filtração de 95%, adotada nos EUA e equivale, no Brasil, à PFF2 ou ao Equipamento de Proteção Respiratória (EPR) do tipo peça semifacial com filtro P2, que possui filtro eficiente para retenção dos contaminantes atmosféricos, como aerossóis contendo agentes biológicos. Pressupõe-se que a obrigatoriedade da pressão negativa visa a redução da concentração de aerossóis, e, portanto, pelo senso de coerência, o uso da máscara N95 no setor deveria também ser recomendada como equipamento de proteção respiratória pelos profissionais que atuam na sala de limpeza,

Diante da crescente preocupação com a segurança dos profissionais de saúde no seu ambiente de trabalho, o que é legítimo, bem como da tomada de decisão baseada em evidências científicas comprovadas, houve a necessidade de avaliar o impacto da pressão negativa na sala de limpeza do CME. Nessa perspectiva, este estudo trouxe respostas para as lacunas do conhecimento existentes quanto aos riscos em ter ou não o sistema de pressão negativa do ar ambiente em relação ao nível de contaminação por bioaerossóis. Possibilitou, também, uma reflexão crítica das legislações vigentes e o conhecimento da dimensão dos riscos biológicos aos quais os profissionais estão expostos durante suas atividades laborais no CME.

2. Objetivo

2 OBJETIVO

Avaliar o impacto da presença da pressão negativa na área de limpeza do CME mediante a qualidade microbiológica do ar desse setor e da área de preparo dos PPS.

3. Revisão da Literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CENTRO DE MATERIAL E ESTERILIZAÇÃO

A RDC nº15 da ANVISA (BRASIL, 2012) define o CME como uma “unidade funcional destinada ao processamento de produtos para saúde dos serviços de saúde”. O processamento é caracterizado pelas atividades de pré-limpeza, recepção, limpeza, secagem, avaliação da funcionalidade e integridade, preparo, desinfecção ou esterilização, armazenamento e distribuição para as unidades usuárias dos PPS.

O CME é classificado de acordo com a capacidade de executar o processamento de produtos para saúde, a depender da complexidade da conformação, em CME Classe I e CME Classe II. Nesta classificação, é considerado CME classe I aquele que executa o processamento de PPS considerados não críticos, semicríticos e críticos de conformação não complexa e que permita o processamento. O CME Classe II é definido como aquele que executa o processamento de produtos para a saúde considerados não críticos, semicríticos e críticos de conformação complexa e não complexa, que permita o processamento. É estabelecido nesse regulamento que material complexo é aquele produto para saúde crítico que possuem lúmen inferior a cinco milímetros ou com fundo cego, espaços internos inacessíveis para a fricção direta, reentrâncias ou válvulas e o CME só pode realizar o processamento de produtos para saúde conforme a sua classificação e compatíveis com a sua capacidade técnica operacional (BRASIL, 2012).

Outra diferença baseada na classificação dos CME classe I e II é quanto a divisão das estações de trabalho em áreas ou salas. O CME Classe I deve possuir as seguintes áreas: sala de recepção e limpeza (setor sujo); área de preparo e esterilização (setor limpo); sala de desinfecção química, quando aplicável (no setor limpo); área de monitoramento do processo de esterilização (no setor limpo); e área de armazenamento e distribuição de materiais esterilizados (setor limpo). No CME Classe I deve ter, no mínimo, barreira técnica entre a área suja e os setores considerados como limpos, podendo as diversas estações de trabalho coexistir num mesmo ambiente. Para o CME Classe II, é obrigatória a separação física da área de recepção e limpeza dos PPS das demais áreas (BRASIL, 2012).

Embora ambos os CME, Classe I e II, realizem o processamento de produtos para saúde, no CME Classe I é vedado o processamento de produtos de conformação

complexa, enquanto no CME classe II é exigido que se mantivesse um sistema de climatização na sala de limpeza com pressão negativa do ar ambiente (BRASIL, 2012).

A sala de recepção e limpeza recebe uma grande quantidade e variados produtos para saúde sujos com secreções orgânicas dos pacientes, como sangue, excreções e secreção, portanto, considerada um dos setores mais contaminados do CME (SILVA, 2011).

É na sala de limpeza que se realiza uma das etapas mais importante do processamento, a limpeza de todos os PPS. Quando a limpeza é realizada inadequadamente pode afetar as fases subsequentes de desinfecção e esterilização (RUTALA; WEBER, 2008).

A RDC nº15 da ANVISA (BRASIL, 2012) define a limpeza como a remoção de sujidades orgânicas e inorgânicas, com consequente diminuição da carga microbiana presente nos produtos para saúde. Nesse processo são utilizados água, detergentes, produtos e acessórios de limpeza, fazendo-se uso de ação mecânica, seja manual ou automatizada, em superfícies internas (lúmen) e externas, de modo a tornar o PPS seguro para manuseio e os semicrítico e críticos preparados, respectivamente, para desinfecção e esterilização.

A ação mecânica é realizada por meio de fricção direta com acessórios indicados (escovas/discos de silicone) na limpeza manual. Em produtos com espaços internos, que não permitem o acesso direto, como exemplo os canulados longos, a ação mecânica é feita com fluido sob pressão ou de forma automatizada por meio da energia ultrassônica. Esta última remove a sujidade por cavitação que consiste na implosão de bolhas de ar formadas por ondas de energia acústica propagadas em soluções aquosas e a implosão das bolhas rompem as ligações que mantêm as partículas ligadas às superfícies dos PPS (RUTALA, WEBER, 2008).

A RDC nº15 da ANVISA (2012) estabelece que os produtos para saúde com conformações complexas devem ser submetidos à limpeza manual e complementada com a automatizada em lavadora ultrassônica. Para os produtos para a saúde canulados, cujo lúmen possua diâmetro interno menor que 5 milímetros, é obrigatório o uso de lavadora ultrassônica com fluxo intermitente e com conectores (BRASIL, 2012).

Para responder a uma dúvida da prática cotidiana dos CME em situações quando a lavadora ultrassônica está inoperante para limpeza de PPS complexos

conforme as recomendações da RDC ANVISA 15/2012, Camargo e colaboradores (2017) comprovaram a eficácia da limpeza manual de pinça e trocater de videocirurgia laparoscópica - PPS estes incluídos na categoria de PPS complexos - avaliando resíduos de proteína, hemoglobina e carboidrato por meio da espectrofotometria. As autoras ressaltam que o sucesso da remoção da sujidade equivalente aos métodos preconizados pela RDC ANVISA 15/2012 deveu-se à possibilidade da fricção direta de todas as superfícies internas e externas dos referidos materiais de conformação complexa.

Além da lavadora ultrassônica outros equipamentos tem sido utilizados em muitos CME para realização da limpeza automatizada, como as lavadoras de jato sob pressão, também conhecidas como lavadoras termodesinfetadoras (a limpeza é seguida da fase de temodesinfecção) e o equipamento de vapor em alta pressão (Steamer®), que vem ganhando espaço no mercado com a indicação por parte do fabricante para pré-limpeza.

Tanto na limpeza manual como na automatizada o uso de agentes químicos, como detergentes, colabora para facilitar o processo de limpeza por atuar na remoção da matéria orgânica (RUTALA; WEBER, 2008). Os detergentes neutros, alcalinos e enzimáticos são comumente utilizados nos estabelecimentos de assistência à saúde. Os enzimáticos são constituídos por diferentes tipos de enzimas, a depender de sua formulação, podem conter protease, lipases, amilase, entre outras, e são capazes de catalisar a hidrólise das ligações químicas dos compostos orgânicos (MAURER, 2010). A RDC nº 55 da ANVISA de 14 de novembro de 2012 que dispõe sobre os detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde, com indicação para limpeza dos produtos para saúde, determina a obrigatoriedade de ter protease em sua formulação, podendo ser adicionada outras enzimas, por exemplo, da subclasse das amilases e lipases.

Após o material ser limpo adequadamente, é transferido para a sala de preparo por meio de uma janela que conecta os dois setores. De acordo com AAMI (2017), essa janela de passagem de materiais deve permanecer fechada, sendo aberta apenas por ocasião da transferência dos produtos para saúde limpos.

Na sala de preparo e esterilização é realizado o preparo de todos os produtos para saúde. Inicialmente, é feita a inspeção quanto à presença de sujidades, por meio de testes visuais e químicos, em busca da presença de corpo estranho e manchas. Testes de funcionalidade e integridade são realizados também nesse setor e os

campos e aventais cirúrgicos são dobrados e confeccionados os pacotes que serão preparados de acordo com o tipo de embalagem compatível ao processo de esterilização que será submetido, normalmente a vapor saturado sob pressão (SILVA, 2011).

De acordo com a RDC nº15 da ANVISA (BRASIL, 2012), a sala de preparo e esterilização do CME Classe II deve dispor dos seguintes requisitos: recursos para transporte de cargas com rodízio; secadora própria para PPS e pistola de ar comprimido medicinal de gás inerte ou ar filtrado, seco e isento de óleo; seladoras de embalagens; estações de trabalho e cadeiras ou bancos ergonômicos com altura regulável.

A sala de preparo e esterilização do CME Classe II também deve manter um sistema de climatização com temperatura ambiente entre 20 e 24°C, garantir vazão mínima de ar total de 18,00 m³/h/m² e manter um diferencial de pressão positivo entre os ambientes adjacentes, com pressão diferencial mínima de 2,5 Pa (BRASIL, 2012).

Após o preparo, os PPS são submetidos à esterilização ou desinfecção, de acordo com a sua classificação de risco de causar infecções. Os materiais esterilizados são armazenados para posterior distribuição para as unidades consumidoras, conforme demanda de cada unidade.

A sala de armazenamento e distribuição de materiais esterilizados deve ter: recursos para transporte com rodízio; escadas, caso seja necessário; prateleiras ou cestos aramados para dispor os pacotes esterilizados. Essa sala de armazenamento deve ser exclusiva para armazenar os produtos para saúde e de acesso restrito, não devendo permanecer em área de circulação (BRASIL, 2012).

Esta breve revisão sobre o CME, teve como foco descrever um pouco o ambiente de interesse do estudo e o regulamento vigente no país, RDC nº15 da ANVISA de 2012. Nos próximos tópicos serão tratados a contaminação aérea nesse setor, especialmente, na realização dos procedimentos de limpeza, e uma discussão do que são os aerossóis e os seus efeitos à saúde, bem como dos sistemas de ventilação e o padrão referencial da qualidade do ar interior.

3.2 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL DURANTE O PROCESSO DE LIMPEZA DE PRODUTOS PARA SAÚDE

Não há uma definição clara ou uma lista precisa dos procedimentos de alto risco de assistência à saúde durante o qual alguns patógenos podem ser transmitidos por gotículas, em curtas distâncias, ou por aerossóis (OMS, 2009). O mecanismo desta transmissão é descrito como uma transmissão por via aérea oportunista (ROY; MILTON, 2004), na qual certos procedimentos podem aumentar o potencial de geração de gotículas ou mesmo de aerossóis, por causa da força mecânica do procedimento. Alguns destes procedimentos têm sido associados a um aumento significativo no risco de transmissão de doenças, e foram denominados de processos de geração de aerossóis associados à transmissão de agentes patogênicos. Entre estes incluem a intubação, ressuscitação cardiopulmonar, broncoscopia, autópsia e cirurgias em que dispositivos com motores de alta velocidade são usados (OMS, 2009).

Esse risco de formação de aerossóis associado à realização de procedimentos, também, foi apontado durante o processo de limpeza manual (escovação e uso da pistola de água sob pressão) e automatizada (BRAYMEN, 1969; TURNER *et al.*, 1975).

A maioria dos estudos citados nessa revisão não foi realizada no ambiente de CME. Entretanto, como muitos dos procedimentos de limpeza são similares quanto ao fenômeno de dispersão de microrganismos independentes do ambiente e seu contexto, bem como dos equipamentos que, possivelmente, são capazes de gerar aerossóis durante o ato de limpar, optou-se em explorá-los para compreensão da geração de bioaerossóis durante o processo de limpeza.

Um estudo, realizado por Braymen (1969), teve por intuito determinar o tamanho das partículas aerossolizadas durante diferentes métodos de limpeza e desinfecção em parede, no Laboratório Nacional de Doenças em Animais de Ames, Iowa (EUA), e a sobrevivência de microrganismos viáveis nestes aerossóis. Foi realizada contaminação intencional da parede com uma suspensão de matéria orgânica e microrganismos (*Serratia marcescens*, esporos do *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium smegmatis*). Após o procedimento de limpeza, com escovação e água sob pressão, amostras de ar foram coletadas por

meio do equipamento *six-stage Andersen sampler*. O local do estudo teve a ventilação controlada com ajuste de uma troca de ar a cada 8 a 10 minutos.

Neste estudo, realizado por Braymen (1969), em ambos os métodos, escovação e água sob pressão, foram quantificados microrganismos em aerossóis com tamanho das partículas menores que 5µm, capazes de passar as barreiras do trato respiratório e se alojar nos pulmões. Foram recuperados microrganismos teste (*Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium smegmatis*) durante e após o processo de limpeza e desinfecção com diferentes agentes químicos (hipoclorito, quaternário de amônia, compostos fenólicos e ácido peracético), sendo que somente para o ácido peracético não houve recuperação dos microrganismos testados. Houve uma recuperação maior de colônias microbianas teste quando empregado o método de limpeza com água sob pressão.

Uma revisão bibliográfica realizada por Madsen e Matthiesen (2013) evidenciou que o uso de água sob pressão para realização de limpeza do ambiente aumenta a contaminação do ar por aerossóis com bactérias, endotoxinas e compostos químicos. O nível de contaminação e a sua composição dependem da quantidade de sujeira presente no produto e do que está sendo limpo, assim como da qualidade da água utilizada.

Em um estudo realizado por Turner e colaboradores (1975), foi verificada a contaminação do ar durante e após a utilização da lavadora ultrassônica. Amostras de ar foram coletadas acima da superfície da água no tanque da lavadora por meio de um amostrador de ar que possuía uma terminação flexível que foi posicionada dentro da lavadora. As amostras de ar foram coletadas nas seguintes situações: antes da lavadora ser ligada, com um tempo de amostragem do ar de 15 minutos; durante o seu funcionamento e após desligada, com tempo de amostragem de 45 minutos. As coletas foram realizadas em duas condições distintas: com o tanque coberto por tampa sugerindo que todos os aerossóis gerados eram oriundos da lavadora; e com o tanque sem tampa, considerando os aerossóis do ar ambiente somados aos gerados pela lavadora. Antes e após a coleta de amostras do ar foram coletadas amostras de nove pontos das superfícies fixas da bancada de trabalho em torno da lavadora, assim como 10 mL da solução de limpeza.

Os resultados, desse estudo (TURNER *et al.*, 1975), evidenciaram maior nível de contaminação com a lavadora em funcionamento. Comparando-se os achados microbiológicos das amostras com e sem tampa, observou-se maior número de

colônias nas amostras com a lavadora fechada com tampa, o que demonstrou a formação de aerossóis em decorrência ao funcionamento da lavadora. Não houve correlação entre o número de bactérias na solução de limpeza e a concentração de aerossóis. Quanto às amostras de superfície não foram encontradas correlações entre os números de colônias isolados antes e após o funcionamento da lavadora. De acordo com as sugestões dos autores, a contaminação das superfícies fixas pode estar relacionada ao derramamento e gotejamento de solução de limpeza no momento em que os instrumentais são inseridos ou retirados da lavadora, independente se estava com ou sem a tampa. Entretanto, os autores recomendam que a lavadora ultrassônica seja usada com a tampa para reduzir a liberação de aerossóis para o ambiente.

Em outro estudo, verificou-se a formação de aerossóis a partir de chuveiros e torneiras com fonte de água quente suspeitas de estarem contaminadas com *Legionella pneumophila*. Primeiramente, amostras de água de torneiras e chuveiros foram coletadas para realização de cultura, assim como *swabs* da superfície interna de ambos. Foram, também, coletadas amostras de ar fora do alcance do jato do chuveiro e de 14 salas que possuíam torneiras com fonte de água quente; nestas, o coletador foi posicionado a 61 cm de distância da torneira. As coletas de ar foram realizadas antes da torneira ser aberta, enquanto estava aberta e depois do fechamento. Para as amostras de ar próximo ao chuveiro, foram isoladas *L. pneumophila* em aerossol quando o coletor de ar foi posicionado acima do chuveiro próximo a porta e não houve recuperação da mesma quando foi posicionado perto do chão. Quanto às amostras coletadas nas áreas próximas as pias, houve recuperação do microrganismo quando a torneira de água quente estava aberta e não houve recuperação antes da sua abertura e após o seu fechamento (BOLLIN *et al.*, 1985).

Embora a maioria dos estudos citados não tenham sido realizados na área de limpeza do CME ou com produtos para saúde, retrata condições que são aplicáveis a este setor. Não foi encontrado nenhum estudo que abordasse a formação de aerossóis com o uso do vapor em alta pressão (Steamer®), um equipamento que vem ganhando espaço na limpeza de produtos canulados, mas que é sabido haver a formação de uma névoa durante o seu uso.

Um estudo de revisão (SILVA *et al.*, 2016), teve por objetivo “analisar as evidências sobre aerossóis gerados durante atividades de limpeza dos produtos para saúde no Centro de Material e Esterilização e o impacto da pressão negativa do ar

ambiente na área de limpeza para controle da dispersão de aerossóis para áreas adjacentes”. Nesta revisão, foi evidenciada que durante as atividades de limpeza no CME há formação de aerossóis.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS EM AEROSSÓIS E SUAS IMPLICAÇÕES À SAÚDE

3.3.1 Aerossóis

O conceito de aerossóis é divergente na literatura e normas nacionais e internacionais. De acordo com o manual da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2006), aerossóis são partículas menores que 5 µm que quando inaladas podem penetrar o trato respiratório inferior. No ambiente, os aerossóis podem permanecer suspensos no ar por longos períodos de tempo, apesar dessa afirmação, neste manual não é especificado quanto seria esse tempo, se em dias, horas ou minutos. Por outro lado, as gotículas são partículas maiores que 5 µm, restringindo-se, quando inaladas, a mucosa das fossas nasais e cavidade bucal, ou seja, o trato respiratório superior. Tradicionalmente, considera-se que quando essas são eliminadas nos ambientes, tende-se a sedimentar nas superfícies pela ação da gravidade.

O *Centers for Disease Control and Prevention* – CDC-EUA (2017b) considera que o conceito de gotículas e aerossóis é uma questão em discussão, em que tradicionalmente, as gotículas foram definidas como partículas maiores que 5 µm, acontecendo portando a transmissão de um agente infeccioso do trato respiratório do indivíduo infectado para o suscetível de uma forma direta a uma curta distância, de até um metro. Entretanto, neste mesmo *guideline* do CDC (2017b) é discutido que a transmissão por gotículas não está bem estabelecida, assim como são citados estudos sobre observações da dinâmica de partículas que demonstraram uma gama de tamanhos de gotículas, incluindo as com diâmetro maior que 30 µm e mesmo assim permanecem suspensas no ar. É sabido também que os núcleos de gotículas (*droplet nuclei*), com tamanhos menores que 5 µm, resultantes de dessecação de gotículas suspensas, têm sido associadas à transmissão aérea.

Quanto a definição de aerossóis pelo CDC (2017b), são considerados como partículas pequenas ou núcleos de gotículas na faixa de tamanho respirável contendo um agente infeccioso e estes podem ser dispersos por longas distâncias e permanecem com potencial infectante ao longo do tempo, a exemplo dos esporos de *Aspergillus spp* e *Mycobacterium tuberculosis*.

Comumente, ao se tratar de um aerossol contendo um microrganismo, esse vem sendo chamado de bioaerossol, diferenciando de aerossóis constituídos de partículas químicas ou sólidas. Dessa forma, os bioaerossóis incluem todas as partículas sólidas e líquidas de origem biológica que são distribuídas no ar ambiente. O tamanho da partícula determina o local de depósito do microrganismo aerossolizado no trato respiratório. O potencial do patógeno inalado para causar a doença é influenciado não só pelo grau de virulência próprio do microrganismo como também pelo tropismo tecidual, pela cinética de eliminação do trato respiratório e pela resposta imunológica do hospedeiro (THOMAS, 2013).

Patógenos aéreos, transmitidos por aerossóis ou gotículas, incluem uma grande variedade de microrganismos e doenças que podem ser altamente infecciosas, como o vírus da gripe A, o vírus do sarampo, *Mycobacterium tuberculosis* e *Streptococcus pneumoniae* (HEFST *et al.*, 2017).

No próximo tópico será abordado com mais detalhes a contaminação do ar ambiente por fungos e bactérias e os possíveis riscos à saúde.

3.3.2 Fungos

Os fungos representam um grupo diverso de microrganismos e estão presentes em todos os lugares, por toda parte, tendo o meio ambiente como habitat natural, a exceção da *Candida albicans*, que está presente na microbiota normal de humanos (CARREIRO *et al.*, 2009; LEVINSON, 2010). A diversidade de fungos é tamanha que já foram descritas mais de 80.000 espécies de fungos, entretanto pouco mais de 400 têm importância clínica, e menos de 50 espécies são responsáveis por mais de 90% das infecções fúngicas em seres humanos (MITCHELL, 2012).

Um estudo publicado no *Atmospheric Environment* (BAUER *et al.*, 2008) sobre as contribuições de esporos de fungos para o carbono orgânico e para o balanço de massa de aerossóis atmosférico urbanos evidenciaram que esporos de fungos podem representar grandes proporções de massa de partículas e carbono orgânico. A

contribuição de esporos fúngicos chegou a representar 60% do carbono orgânico em aerossóis grosseiros, sendo considerados como componentes principais para materiais particulados PM10 (sigla em inglês de *particulate matter*), carbono orgânico total e carbono orgânico grosseiro. Os PM10 são poluentes atmosféricos formados por diferentes partículas com diâmetro menor ou igual a 10 µm. Os esporos de fungos são considerados componentes onipresentes de aerossóis atmosféricos.

Os fungos foram encontrados até mesmo em nuvens, precipitação e nevoeiro. O ar é o principal meio para a dispersão dos esporos de fungos, mas a diversidade de fungos no ar não é bem conhecida. Métodos tradicionais de cultura, microscopia e técnicas bioquímicas têm sido insuficientes para traçar a ampla cobertura de diferentes espécies de fungos, além disso, os estudos com técnicas moleculares ainda são muito limitados (FRÖHLICH-NOWOISKY *et al.*, 2009).

Até 1969, os fungos eram considerados como vegetais, a partir desse período foram classificados como pertencentes ao Reino Fungi. São comumente conhecidos como mofo, bolores, cogumelos e leveduras (CARREIRO *et al.*, 2009). São microrganismos eucarióticos, suas células são compostas por pelo menos um núcleo e uma membrana nuclear, mitocôndrias, retículo endoplasmático e aparelho secretor. A maioria dos fungos são aeróbicos obrigatórios ou facultativos. Tendo em vista que são seres eucariotos, os fungos partilham inúmeros genes homólogos, produtos gênicos e vias metabólicas com seus hospedeiros humanos, o que contribui para existência de poucos alvos específicos para quimioterapia e antibióticos efetivos. Quanto aos mecanismos de patogenicidade fúngica são complexos e poligênicos (MITCHELL, 2012).

A classificação dos fungos se baseia em aspectos morfológicos, os quais crescem em duas formas básicas: leveduras e bolores. Na forma de bolor, ou seja fungos filamentosos, o crescimento se dá pela produção de colônias filamentosas multicelulares constituindo-se em túbulos cilíndricos ramificados, denominados de hifas, em que o diâmetro pode variar de 2 a 10 µm. Algumas hifas formam paredes transversais que as dividem em células, conhecidas como hifas septadas, outras ao contrário, são conhecidas como hifas não septadas, estas são multinucleadas ou cenocíticas. Durante o crescimento ativo, o acúmulo da massa de hifas emaranhadas é conhecido como micélio. As hifas que penetram no meio nutritivo de cultivo e absorvem nutrientes são de substrato ou vegetativas, em quanto as hifas aéreas projetam-se acima da superfície do micélio (LEVINSON, 2010; MITCHELL, 2012).

Em laboratório, em condições padronizadas de crescimento, os bolores desenvolvem colônias com aspectos característicos, como textura, pigmentação e taxa de crescimento. A identificação do gênero e até mesmo da espécie da maioria dos fungos filamentosos clínicos pode ser determinada mediante análise microscópica da morfologia de seus esporos reprodutivos assexuados, conhecidos como conídios (MITCHELL, 2012). Como o presente estudo utilizou as características morfológicas na identificação dos fungos, o tema será explorado nesta revisão para melhor compreensão do método.

Contrariamente à forma de bolor, as leveduras são células únicas, comumente encontradas em formato esférico a elipsoide, com diâmetro variando entre 3 a 15 μm . Apesar das leveduras serem células isoladas, algumas espécies ao se reproduzir por brotamento não se separam, o que as tornam alongadas e em cadeia, sendo denominadas de pseudo-hifa. Em sua maioria, as colônias de leveduras apresentam uma consistência mole, opacas e coloração creme, possuindo tamanho de um a três milímetros. Muitas leveduras apresentam morfologia e colônias muito semelhantes, necessitando a realização de testes fisiológicos e a observação de algumas diferenças morfológicas essenciais (MITCHELL, 2012).

Ainda têm algumas espécies de fungos que são dimórficas, dependendo das condições ambientais, podem crescer em formato de levedura ou bolor (MITCHELL, 2012). O dimorfismo, geralmente, ocorre por condições térmicas, formando estruturas distintas a depender da temperatura. Em temperatura ambiente pode apresentar-se na forma de bolor no meio externo, enquanto nos tecidos humanos, à temperatura corpórea, como leveduras (LEVINSON, 2010).

Os fungos, além do seu crescimento vegetativo em forma de bolores ou leveduras, são capazes de produzir esporos que aumentam a sua sobrevivência. Os esporos são mais resistentes às condições adversas e podem germinar quando forem restabelecidas as condições favoráveis para o seu crescimento. Além disso, os esporos conseguem se dispersar facilmente pelo ambiente. A reprodução pode ser assexuada ou sexuada. Os esporos assexuados realizam divisão mitótica, sendo geneticamente idênticos. Dois tipos principais de esporos assexuados têm importância clínica, os conídios e os esporangiósporos. O arranjo dos conídios, a morfologia e a coloração contribuem na identificação dos fungos (LEVINSON, 2010; MITCHELL, 2012). Além disso, os conídios são facilmente transportados pelo ar, o

que contribui para a disseminação dos fungos pelo ambiente (CARREIRO *et al.*, 2009).

A inalação de esporos fúngicos pode desencadear reações imunológicas, podendo haver uma hipersensibilidade que resultaria em reações alérgicas depois da exposição aos antígenos do fungo. As alergias a esporos fúngicos, especialmente o *Aspergillus spp.* por ser um alérgeno comum e potente, apresentam manifestações clínicas de hipersensibilidade, principalmente, reação asmática com broncoconstrição rápida mediada por IgE, eosinofilia e ao teste cutâneo uma reação de urticária e ardor (CARREIRO *et al.*, 2009; LEVINSON, 2010).

Alguns patógenos fúngicos podem produzir uma infecção primária no pulmão se disseminando, posteriormente, para outros órgãos e tecidos. Os fungos patogênicos clássicos em resultar em infecção em humanos são: *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*. Uma característica comum a esses fungos é apresentar dimorfismo térmico, em que a uma temperatura de 25°C apresentam-se em forma de bolor e desenvolvem-se como leveduras a uma temperatura de 37°C. As infecções por estes microrganismos são consideradas micoses sistêmicas ou também conhecidas como endêmicas, em que os microrganismos são verdadeiros patógenos capazes de causar infecção em pessoas saudáveis. Entretanto, no geral, se restringem a regiões geográficas, ocupando um nicho ecológico ou ambiental específico (CARREIRO *et al.*, 2009).

3.3.3 Bactérias

As bactérias pertencem aos procariotos por suas células apresentarem uma estrutura interna mais simples, desprovida de organelas envoltas por membranas (MADIGAN *et al.* 2010). Entre as características principais que diferem os procariotos está o tamanho pequeno, comumente na ordem de 1 µm de diâmetro (BROOKS *et al.*, 2012). O tamanho das bactérias pode variar de 0,2 a 5 µm, a exceção as bactérias bacilares mais longas que podem possuir tamanho de até 7 µm, semelhante a algumas leveduras (LEVINSON, 2010).

As bactérias podem ser classificadas, morfolologicamente, como bacilos, cocos, espirilos, espiroquetas, filamentosas e apendiculares (MADIGAN *et al.*, 2010). Além dessas características, o arranjo das bactérias também é um aspecto importante na

identificação microscópica desses microrganismos. Quando o arranjo ocorre em pares nos cocos, por exemplo, são chamados de diplococos, em cadeia são os estreptococos e em agrupamentos tipo cacho de uvas, estafilococos (LEVINSON, 2010).

Outra classificação das bactérias baseia-se nas características morfológicas, pela reação de coloração de Gram são distinguidas em dois grupos principais, Gram-positivos e Gram-negativos. Esta distinção deve-se às especialidades da parede celular (MADIGAN *et al.*, 2010).

A parede celular das bactérias Gram-negativas apresenta uma membrana externa e uma ou poucas camadas de peptidoglicana. A peptidoglicana está ligada às lipoproteínas na membrana externa e no periplasma – um fluido semelhante a um gel que, está localizado entre a membrana externa e a membrana plasmática, apresenta alta concentração de enzimas de degradação e proteínas de transporte. A parede celular das Gram-negativas são mais vulneráveis ao rompimento mecânico por não possuir ácidos teicoicos. Contrariamente, em bactérias Gram-positivas, a parede celular constitui-se de ácidos teicoicos que dificultam a ruptura da parede celular e regulam a movimentação de cátions para o interior e exterior da célula, assim como de multicamadas de peptidoglicana (TORTORA *et al.*, 2012).

Dentre as bactérias presentes em bioaerossóis, dois gêneros apresentam grande importância epidemiológica, as legionelas e as micobactérias. Nessa perspectiva, serão mais bem detalhadas nessa revisão de literatura, por terem sido alvos de interesse na coleta de dados do presente estudo.

3.3.3.1 *Legionelas*

As legionelas são bacilos gram-negativos aeróbicos exigentes que fracamente se coram pelo método padrão de coloração de Gram e em amostras clínicas não são visualizadas em coloração (BROOKS *et al.*, 2012; LEVINSON, 2010; BURILLO *et al.*, 2017). O tamanho das legionelas pode variar de 0,5 a 1 µm de largura e de 2 a 50 µm de comprimento. Estas bactérias crescem lentamente, em geral, somente a partir do terceiro dia de incubação começam aparecer colônias visíveis, em meio de cultura complexo, como o ágar de extrato de levedura-carvão tamponado com α-cetoglutarato e ferro, pH de 6,9 e à temperatura de 35°C (BROOKS *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, já foram identificadas mais de 58 espécies e mais de 70 sorogrupos distintos de legionelas. Embora sejam potencialmente patogênicas, a legionelose é causada pelo sorotipo 1 da *Legionella pneumophila*, e foi responsável pelo surto da doença dos legionários em 1976, o que deu o nome a este microrganismo (BURILLO *et al.*, 2017). A Legionelose é o nome comum para duas infecções em humanos: doença do legionário e febre de Pontiac, que também têm a *Legionella* como agente etiológico (PRINCIPE *et al.*, 2017; BURILLO *et al.*, 2017). Cerca de 90% das pneumonias atribuídas às legionelas são causadas pela *L. pneumophila*, os 10% restantes têm como agentes, em sua maioria, as espécies *Legionella micdadei* e *Legionella bozemanii* (LEVINSON, 2010).

As legionelas têm como *habitats* naturais locais com fonte de água, estando presentes em lagos, termas, rios e sistemas de água aquecida. Desenvolve-se melhor em água quente, na presença de amebas de vida livre, por multiplicar-se nesta da mesma maneira que o fazem nos macrófagos pulmonares, e em biofilmes. Em condições adversas do ambiente, as amebas se encistam, favorecendo também a sobrevivência das legionelas, quando o desencistamento ocorre devido as melhores condições do ambiente. As legionelas conseguem sobreviver a tratamentos de água, proliferando nos sistemas de distribuição de água (BROOKS *et al.*, 2012).

A infecção por legionela ocorre, principalmente, em pacientes debilitados ou imunocomprometidos ao inalar bioaerossóis de legionelas disseminados em chuveiros, torres de refrigeração, entre outros (BROOKS *et al.*, 2012, BURILLO *et al.*, 2017). Como o CME possui diversos equipamentos com fontes de água quente, a exemplo do vapor em alta pressão (Steamer®) e das duchas e torneiras, capazes de aerossolizar esse microrganismo, caso estivesse presente nas fontes de água que abastecem esses equipamentos, optou-se realizar coletas de ar com meios de cultura seletivos para *Legionella spp.*

Um estudo de revisão bibliográfica teve entre seus objetivos revisar os achados sobre exposição de risco ocupacional a *Legionella*, destacar as atividades de trabalho com maior risco para legionelose e fornecer taxas de infecção para pacientes que adquiriram legionelose ocupacionalmente. Neste estudo, foram analisados estudos publicados entre 1978 a 2016, sendo selecionados 47 estudos que relataram casos confirmados de legionelose entre trabalhadores. Os locais de trabalho com maior frequência desses casos de legionelose ocupacional foram: indústrias (62,0%); escritórios (27,3%); estabelecimentos de assistência à saúde (6,3%); e em menor

número uma variedade de locais como horticulturas, escavação de poços artesianos, usinas de tratamento de água e esgoto, navios, entre outros. Em todas as situações, a origem da infecção foi a exposição a aerossóis contaminados com *Legionella* disseminados no local de trabalho, principalmente, pela torre de refrigeração de alguns sistemas de condicionamento do ar (PRINCIPE *et al.*, 2017).

3.3.3.2 *Micobactérias*

As micobactérias são bacilos aeróbios e não formam esporos. Devido a sua característica acidorresistente, ou seja, resistem à descoloração por ácido ou álcool na coloração de Gram, não é possível classificá-las como gram-positivas ou gram-negativas. Essa característica é devida sua parede celular possuir vários lipídeos complexos, como os ácidos micólicos, que são constituídos por ácidos graxos de cadeia longa de C78 a C90, o que contribuem para a acidorresistência (BROOKS *et al.*, 2012; LEVINSON, 2010).

Além disso, os componentes da parede celular das micobactérias, também, conferem virulência aos bacilos e resistência a antibióticos e a ambientes hostis. A parede celular é uma estrutura complexa e robusta composta por uma membrana plasmática, periplasma, uma parede celular e uma camada exterior semelhante a uma cápsula, formando um envoltório celular complexo (SINGH *et al.*, 2018).

Há mais de 125 espécies de *Mycobacterium*, entretanto o que tem maior importância clínica e epidemiológica é o *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose, cuja transmissão é aérea por aerossóis contendo este microrganismo (BROOKS *et al.*, 2012).

O *M. tuberculosis* é um bacilo reto e fino, com tamanho de cerca de 0,4 x 3 µm (BROOKS *et al.*, 2012). Este microrganismo apresenta crescimento lento, por isto as culturas para serem consideradas negativas devem ser mantidas por seis a oito semanas. Os meios de culturas usados para o seu crescimento, a exemplo do Lowenstein-Jensen, têm nutrientes complexos, como gema de ovo, e corante verde de malaquita, o que inibe o crescimento de outras bactérias indesejáveis (LEVINSON, 2010).

O *M. tuberculosis* é aeróbico obrigatório, o que justifica sua predileção por tecidos altamente oxigenados como o lobo superior do pulmão. O *M. tuberculosis* pode se alojar em outros sítios do corpo humano, como os rins e ossos. Esse bacilo é resistente ao ressecamento e sobrevive no escarro seco por longos períodos,

podendo ser essa propriedade importante na sua transmissão por aerossóis (BROOKS *et al*, 2012; LEVINSON, 2010).

A transmissão do *M. tuberculosis* ocorre interpessoalmente por aerossóis respiratórios. Pessoas infectadas ao tossir, falar ou espirrar liberam gotículas com cerca de 25 µm de diâmetro, que evaporam ou perdem parte do líquido no atrito com ar ambiente permitindo que o microrganismo fique suspenso em aerossóis, podendo ser inalados. Ao ser inalado, por ser um microrganismo pequeno o suficiente para atingir os alvéolos pulmonares, infecta os macrófagos e outras células reticuloendoteliais, onde se multiplica. Após o período de um a dois meses da exposição inicial, aparecem nos pulmões as lesões patogênicas. Entretanto, o desenvolvimento dessas lesões, bem como sua progressão ou cicatrização, é determinada, principalmente, pela quantidade de micobactérias no inóculo, por sua multiplicação subsequente e pelo estado imunológico do hospedeiro (SINGH *et al.*, 2018; BROOKS *et al*, 2012).

Na maioria dos casos, a multiplicação dos bacilos da tuberculose é evitada pela forte resposta imunológica do hospedeiro, entretanto os bacilos viáveis podem permanecer em estado latente por anos, resultando em infecção por tuberculose latente. Os indivíduos com infecção latente não transmitem o *M. tuberculosis* e são assintomáticos clinicamente, porém pode haver reativação da tuberculose latente e o bacilo se tornar ativo (SINGH *et al.*, 2018).

Um estudo que teve por objetivo estimar a prevalência de infecção latente pelo *M. tuberculosis* e identificar os fatores de risco associados a essa infecção entre profissionais de saúde da atenção básica de saúde, identificou uma alta prevalência de infecção latente entre os profissionais avaliados (LACERDA *et al.*, 2017).

No presente estudo, foram realizadas análises quanto à possibilidade de micobactéria em bioaerossóis no CME por considerar que materiais contaminados com este microrganismo, especialmente, a *M. tuberculosis*, poderia ser aerossolizada no processo de limpeza dos produtos para saúde, tornando-se um potencial risco à saúde dos profissionais atuantes neste setor.

3.4 SISTEMA DE VENTILAÇÃO AMBIENTE E AS RECOMENDAÇÕES NACIONAIS E INTERNACIONAIS PARA ÁREA DE LIMPEZA DO CME

Em um ambiente interno que se pretenda manter saudável e confortável, a qualidade do ar deve ser garantida, sendo que esta pode ser obtida por meio da remoção do contaminante ou por sua diluição. Para tanto, a ventilação desempenha um papel muito importante, sendo definida como “o mecanismo pelo qual o ar é fornecido a um recinto, seja por meios naturais ou mecânicos” (STOECKER; JONES, 1985).

De acordo com a OMS (2009; 2014), existem três tipos de ventilação do ambiente: (a) ventilação mecânica ambiental, na qual usa ventiladores mecânicos para introduzir ou propiciar a exaustão do ar para o exterior ou ainda trata adequadamente o ar reciclado para dentro ou fora de um edifício ou sala; (b) ventilação natural do ambiente - usa forças naturais para introduzir e distribuir ar exterior para um edifício. Essas forças incluem pressão do vento ou a pressão gerada pela diferença de densidade entre o ar interior e exterior. Esta ventilação natural depende do clima, do projeto de construção e do comportamento humano; (c) ventilação de modo misto ou híbrido do ambiente – combina ventilação mecânica e natural. A ventilação mecânica é usada quando a taxa de fluxo de ventilação natural é muito baixa.

O objetivo central da ventilação é fornecer ar puro para respirar, diluindo e removendo os poluentes originários do prédio ou sala. São considerados três elementos básicos da ventilação de edifício: (1) taxa de ventilação – a quantidade de ar que é fornecido para o espaço e a qualidade do ar exterior que entra; (2) direção do fluxo de ar – a direção do fluxo de ar deve ser de zonas limpas para zonas sujas; e (3) distribuição de ar ou padrão de fluxo de ar – o ar externo deve ser entregue a cada parte do espaço de maneira eficiente e os poluentes transportados pelo ar gerados em cada parte do espaço também devem ser removidos de maneira eficiente (OMS, 2009).

Ainda de acordo com a OMS (2009), considerando estes três elementos básicos da ventilação, o desempenho da ventilação em edifícios pode ser avaliado a partir dos seguintes aspectos:

- O sistema fornece a taxa de ventilação suficiente, conforme exigido?

- A direção geral do fluxo de ar em um edifício é a partir de zonas limpas para sujas (a exemplo, quarto de isolamento e laboratório)?
- Qual é a eficiência do sistema no fornecimento de ar livre para cada local do quarto?
- Qual é a eficiência do sistema na remoção dos poluentes atmosféricos de cada local da sala?

Frequentemente, são utilizados dois índices de desempenho geral: a eficiência da troca de ar, que indica quão eficaz o ar fresco está sendo distribuído na sala, enquanto a eficácia de ventilação indica o grau de eficiência em que o poluente está sendo removido da sala (OMS, 2009).

A ventilação natural tem sido promovida nos serviços de saúde nacional do Reino Unido como estratégia para redução de carbono lançado no ambiente e diminuição do consumo de energia. Nessa perspectiva, foi criado o *National Institute for Health Research*, para explorar o potencial de estratégias que favoreça a ventilação a baixa energia e a refrigeração do ambiente por meio de projetos de construção de novos hospitais. Estes projetos visam que as novas construções tenham menor dependência de controle ambiental mecânico, ar condicionado, sistema de refrigeração, ventiladores e iluminação artificial associada ao aumento de consumo de energia (SHORT; AL-MAIYAH, 2009).

A OMS (2009) pontua algumas vantagens e desvantagens tanto no uso da ventilação natural como da mecânica nos hospitais, algumas delas descritas a seguir:

As vantagens da ventilação natural em comparação ao sistema de ventilação mecânica são: pode oferecer uma alta taxa de ventilação e é mais econômica, devido ao uso de forças naturais e grandes aberturas; dispensa o consumo de energia elétrica; se devidamente concebida, a ventilação natural pode ser confiável; tem a capacidade de fornecer uma taxa muito elevada de trocas de ar a baixo custo, com sistema muito simples, principalmente, em edifícios modernos que foram projetados e operados corretamente para fornecer sistema de ventilação natural (OMS, 2009).

Em contraposição, a ventilação natural é variável e depende das condições climáticas; as duas forças motrizes (vento e diferença de temperatura) que geram a taxa de fluxo de ar podem variar. A ventilação natural pode ser difícil de controlar, como o fluxo de ar ser alto em alguns locais e estagnado em outros. Existe a possibilidade de ter uma baixa taxa de troca de ar durante condições climáticas desfavoráveis como em épocas de rigoroso inverno onde as janelas permanecem

fechadas. Pode haver dificuldade em controlar a direção do fluxo de ar, devido à ausência de uma pressão negativa bem sustentada, sendo, por conseguinte, a contaminação de corredores e salas adjacentes um risco. Outro ponto é que a ventilação natural impede o uso de filtros de partículas, e por questões culturais, de clima ou ainda de segurança podem ditar que as janelas e aberturas permaneçam fechadas. Nessas circunstâncias, as taxas de ventilação podem ser muito menores. A ventilação natural só funciona quando as forças naturais estão disponíveis. Nessa perspectiva, alguns inconvenientes, tais como ruído, poluição do ar e acesso de insetos quando janelas não são teladas, também precisam ser considerados (OMS, 2009).

O sistema de ventilação mecânica se bem concebido, instalado e mantido, há um número considerável de vantagens, tais como: é considerado para ser confiável em dispensar a vazão projetada, independentemente dos impactos da variação do vento e da temperatura ambiental. Como a ventilação mecânica pode ser integrada ao ar condicionado, à temperatura do ar interior e a umidade também podem ser controladas. Sistema de filtração pode ser instalado em ventilação mecânica para que microrganismos prejudiciais, partículas, gases, vapores e odores possam ser removidos. O fluxo de ar pode ser controlado e pode ser implementado em todos os lugares quando a eletricidade está disponível (OMS, 2009).

No entanto, os sistemas de ventilação mecânica, também, podem apresentar problemas, como: muitas vezes não funcionarem conforme projetado e a operação normal pode ser interrompida por diversas razões, incluindo falha no equipamento, *design* inadequado, má manutenção ou gestão incorreta. Os profissionais que frequentam o ambiente não conseguem avaliar se a renovação do ar interno está acontecendo. Os custos de instalação e, particularmente, de manutenção para a operação de um sistema de ventilação mecânica podem ser muito altos. Caso não seja corretamente instalado ou mantido devido à falta de recursos financeiros, o seu desempenho será comprometido podendo repercutir na saúde das pessoas que convivem nesses ambientes. Devido a estes problemas, tanto o sistema de ventilação mecânica, assim como o natural, podem resultar na propagação de doenças infecciosas de transmissão aérea o que demanda atenção dos gestores (OMS, 2009).

Embora haja limitações de ambos os sistemas de ventilação, tanto natural quanto mecânica, recomendações nacionais e internacionais indicam o uso de um diferencial de pressão negativo na área de limpeza do CME.

Conforme já explicitado, a RDC nº15 da ANVISA (BRASIL, 2012), no Art. 52, estabelece que a área de limpeza do CME classe II deve manter temperatura ambiente entre 18° e 22°C; garantir vazão mínima de ar total de 18,00 m³/h/m²; manter diferencial de pressão negativo entre os ambientes adjacentes, com pressão diferencial mínima de 2,5 Pa; e prover exaustão forçada de todo ar da sala com descarga para o exterior da edificação.

De acordo com as recomendações internacionais, a *American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers* (ASHRAE, 2013) estabelece que a temperatura nesta área deva ser controlada entre 15,6°C a 18,3°C; com uma faixa de umidade relativa de 30% a 60%; com diferencial de pressão negativo e os requisitos para as trocas de ar e filtragem semelhantes a um centro cirúrgico, com o mínimo de duas trocas de ar por hora e um total de seis trocas de ar por hora.

A *Association for the Advancement of Medical Instrumentation* (AAMI), na versão recém-revisada ANSI/AAMI ST79:2017, não descreve os padrões recomendados quanto ao sistema de pressão negativa na sala de limpeza. Entretanto, o documento indica seguir as versões anteriores, que recomendam que a área de limpeza tenha diferencial de pressão negativo com um mínimo de dez trocas de ar por hora, de modo que todo o ar seja expelido para o exterior, mantendo a umidade relativa do ar entre 30 a 60% e temperatura entre 16 a 18°C.

A ABNT NBR 7256 (2005) que dispõe sobre o “Tratamento de ar em estabelecimentos assistenciais de saúde (EAS) – Requisitos para projeto e execução das instalações” também recomenda manter um diferencial de pressão negativo na área de limpeza do CME com vazão mínima de ar total de 18 m³/h/m², não estabelecendo parâmetros de temperatura ou umidade relativa do ar. Quanto à classificação de risco de ocorrência de eventos adversos à saúde por exposição ao ar ambiente, nesta Norma, a sala de limpeza do CME é classificada como Nível 1.

Essa classificação considera os seguintes requisitos: Nível 0 – quando a área não excede o risco daquele encontrado em ambientes de uso coletivo e público; Nível 1 - corresponde a “área onde não foi constatado risco de ocorrência de agravos à saúde relacionados à qualidade do ar, porém algumas autoridades, organizações ou investigadores sugerem que o risco seja considerado”; Nível 2 – quando a área possui fortes evidências, baseadas em estudos experimentais, clínicos ou epidemiológicos bem delineados, de ocorrência de agravos à saúde relacionados à qualidade do ar, de seus ocupantes ou de pacientes que farão uso de produtos manipulados nesta

área; Nível 3 – “área onde existem fortes evidências de alto risco de ocorrência de agravos sérios à saúde relacionados à qualidade do ar, de seus ocupantes ou pacientes que utilizarão produtos manipulados nestas áreas, baseadas em estudos experimentais, clínicos ou epidemiológicos bem delineados” (ABNT, 2005).

Essa regulamentação da ABNT NBR 7256 (2005) está passando por revisão, em “Projeto de revisão ABNT NBR 7256 mar 2018” (ABNT/CB-055, 2018), e esteve em consulta pública nacional até o dia 20 de maio de 2018. Apesar da linguagem pouco clara da descrição dos ambientes dos serviços de saúde (não utilizando a linguagem padronizada na área da saúde), essa revisão introduziu mudanças quanto a classificação de risco. Nesta revisão é posto que “CME – Central de esterilização (área limpa)” apresenta nível de risco 1, devendo controlar os agentes biológicos, ter vazão mínima de ar exterior de duas renovações por hora, classe de filtragem do ar insuflado G4/F8, vazão mínima de ar insuflado de 12 movimentações por hora, manter a temperatura entre 20 a 24°C e umidade entre 30 a 60%. Enquanto, para a sala de limpeza do CME não foi encontrada recomendação. Existe, neste documento, uma descrição de “sala para recebimento, pesagem, classificação e lavagem (área suja)”, que supostamente corresponde a lavanderia, com classificação do nível de risco máximo 3: “área onde existem fortes evidências de alto risco de ocorrência de agravos sérios à saúde relacionados à qualidade do ar, de seus ocupantes ou pacientes que utilizarão produtos manipulados nestas áreas, baseadas em estudo experimentais, clínicos ou epidemiológicos bem delineados”.

3.5 PADRÃO REFERENCIAL DE QUALIDADE DO AR INTERIOR

Nas condições habituais, não é comum encontrar um ambiente isento de microrganismos, e não existe a pretensão de ter um ar ambiente totalmente puro, mas atingir um grau de pureza que não ofereça riscos à saúde nem a médio nem a longo prazo (MACINTYRE, 1990).

Apesar da ASHRAE (2013) estabelecer recomendações para o condicionamento do ar ambiente em hospitais e clínicas, não é exposto, neste manual, o limite de contaminação de contaminantes biológicos no ar aceitável para este ambiente.

A Resolução RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003, da ANVISA sobre padrões referenciais de qualidade do ar interior em ambientes climatizados artificialmente de

uso público e coletivo (BRASIL, 2003) estabelece o limite aceitável de contaminação microbiológica do ar apenas para fungos, em que o valor máximo recomendável deve ser ≤ 750 UFC/m³ de fungos. Nesta resolução é estabelecido também que a relação de fungos no ambiente interior em comparação ao ambiente exterior deve ser menor ou igual a 1,5.

Os valores estabelecidos pela Resolução RE nº 9 da ANVISA (BRASIL, 2003) são bastante questionados na tese de Távora (2003), publicada no mesmo ano desta resolução. Foram apontadas várias limitações e críticas ao padrão referencial estabelecido. Um dos pontos criticados foi que esta resolução utilizou como referência para estabelecer o valor máximo de 750 UFC/m³ de contaminantes fúngicos no ar um estudo realizado por Kulcsar e Siqueira (1999, apud TÁVORA, 2003), com várias limitações. É posto que no estudo de Kulcsar e Siqueira, o valor de 750 UFC/m³ foi obtido considerando apenas a quantidade de esporos de *Penicillium spp.* que seria capaz de desencadear broncoespasmos em um paciente com hipersensibilidade a esse microrganismo. Os autores justificaram o uso desse esporo para realização do cálculo que chegou a 750 UFC/m³ por considerá-lo como o mais prevalente em ambientes interiores do Brasil, apesar de estudos evidenciarem uma variedade de fungos (TÁVORA, 2003).

Os contaminantes microbiológicos do ar interior de relevância para a saúde são amplamente heterogêneos. Como as pessoas são expostas frequentemente a múltiplos agentes biológicos e químicos simultaneamente torna-se complexo estimar com precisão as espécies individuais de microrganismos e outros agentes biológicos que são responsáveis pelos efeitos prejudiciais sobre a saúde, sendo quase inviável identificá-los. Apesar da dificuldade de determinar conclusivamente os agentes causadores de efeitos adversos à saúde, um nível excessivo de quaisquer agentes microbianos num ambiente torna-se um risco potencial a saúde, principalmente, do ponto de vista que o crescimento microbiano pode resultar em uma quantidade maior de esporos, alérgenos, endotoxinas, micotoxinas, compostos orgânicos voláteis, fragmentos de células, entre outros (WHO, 2009).

3.6 REFERENCIAL METODOLÓGICO

3.6.1 Equipamentos utilizados em coleta microbiológica do ar

O interesse pela análise de microrganismos dispersos no ar ambiente resultou na introdução de vários amostradores de ar portáteis, que coletam microrganismos diretamente no meio de cultura por meio de altas taxas de fluxos de ar amostrado. Entretanto, o desempenho de um amostrador de bioaerossóis precisa ser avaliado, por suas performances físicas e biológicas. No que se refere ao desempenho por performance física é avaliada a curva de eficiência em que indica a fração de partículas que serão removidas do ar e depositadas no meio de coleta. Quanto ao desempenho biológico dos amostradores é considerada a capacidade de manter as propriedades biológicas das partículas, ou seja, a competência dos microrganismos permanecerem cultiváveis após o impacto no meio de cultura, sem dano celular (YAO; MAINELIS, 2007).

Em um estudo (YAO; MAINELIS, 2007) foram avaliados amostradores de ar de diferentes marcas quanto ao desempenho na captura de bioaerossóis de bactérias e fungos. Os amostradores de ar avaliados foram: *MAS-100* (EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, NJ, EUA) com capacidade de operação de fluxo de ar de até 100 l/min; *Microflow* (Aquaria srl, Lacchiarella, Itália) com taxa de fluxo de ar de até 120 l/min; *BioCulture* (AP BUCK Inc., Orlando, FL, EUA), fluxo de até 120 l/min; *SMA MicroPortable* (Veltek Associates, Inc., Phoenixville, PA, EUA), 141,5 l/min; *SAS Super 180* (Bioscience International, Inc., Rockville, MD, EUA) com fluxo de até 180 l/min; *Millipore Air Tester* (Millipore Corp., Billerica, MA, EUA) com taxa de fluxo de até 140 l/min e; *RCS High Flow* (Biotest Diagnostics Corp., Denville, NJ, EUA) com capacidade de fluxo de ar de até 100 l/min. Espécies de bactérias e fungos, com diâmetro aerodinâmico variando de 0,61 a 3,14 µm, foram aerossolizadas para testar a eficiência de coletas de bioaerossóis pelos diferentes amostradores. Os equipamento *RCS High Flow* e *SAS Super 180* apresentaram melhor eficiência para coleta de fungos, com uma captura de 80 a 90% de esporos fúngicos. Enquanto para coleta de bactérias, os amostradores *RCS High Flow* e *MAS-100* capturaram de 20 a 30% das bactérias aerossolizadas. Os demais amostradores apresentaram eficiência menor que 10% na coleta de bactérias do ar.

Inicialmente, ainda na fase do projeto do presente estudo, havia sido cogitado o uso do amostrador de ar *Millipore air tester*. Entretanto, como no estudo de Yao e Mainelis (2007), o mesmo apresentou baixo desempenho para captura de microrganismos, principalmente bactérias, foi descartada a possibilidade de ser usado na coleta de dados. Este amostrador de bioaerossóis teve uma eficiência menor que 10% para captura de bactérias em aerossóis e cerca de 60 a 80% para fungos dependendo do tamanho dos mesmos. Quanto menor o diâmetro do microrganismo, menor o desempenho desse amostrador para captura de bioaerossóis.

Um estudo avaliou a eficiência de amostradores de bioaerossóis na captura de bactérias presentes no ar (LUNDHOLM, 1982). Os amostradores de ar foram: *Casella slit sampler*, modelo Mk II (C. F. Casella & Co.Ltd., Londres), com taxa de fluxo de ar de 30 l/min; e o *six-stage Andersen sampler*, com taxa de fluxo de 28,3 l/min. Bioaerossóis de *Staphylococcus epidermidis* e *Serratia marcescens* foram aerossolizados. Experimentos em duas indústrias diferentes também foram realizados. O *six-stage Andersen sampler* apresentou uma eficiência significativamente maior ($p < 0,001$) no isolamento de bioaerossóis em bactérias em relação ao outro amostrador estudado.

Em outro estudo que comparou oito amostradores de bioaerossóis para bactérias, o *six-stage Andersen* também apresentou melhor eficiência na captura de bactérias, com resultados comparáveis ao AGI-30. Ambos equipamentos têm sido sugeridos como os amostradores de escolha para coleta de microrganismos viáveis (JESSEN *et al.*, 1992).

Portanto, o amostrador de bioaerossóis *six-stage Andersen* foi escolhido para realizar as coletas de ar do presente estudo.

3.6.2 Amostrador de ar *six-stage Andersen* e a tabela de conversão

O amostrador de ar *six-stage Andersen sampler* consiste em um captador de fluxo de ar que contém seis estágios constituídos por uma placa perfurada com 400 orifícios sobre cada placa com o meio de cultura apropriado para grupos microbianos de interesse. A cada estágio, os tamanhos dos orifícios diminuem, as partículas maiores são retidas decrescentemente em tamanho nas placas anteriores com o meio de cultura. Os tamanhos dos orifícios diminuem de 0,0465 a 0,0100 polegadas nos estágios (ANDERSEN, 1958). Autores que têm citado o Andersen (1958) realizaram

uma conversão das medidas dos diâmetros para micrometros, conforme segue: no estágio 1, os orifícios possuem 7,0 μm ; estágio 2, os orifícios têm 4,7 μm ; estágio 3, os orifícios têm 3,3 μm ; estágio 4, os orifícios diminuem para 2,1 μm ; estágio 5, a 1,1 μm ; estágio 6, os orifícios possuem 0,65 μm (XU; YAO, 2013). A taxa de fluxo de ar é de 28,3 l/min.

No artigo de Andersen (1958), autor do amostrador de ar *six-stage Andersen sampler*, está indicado realizar a conversão da quantidade de UFC do terceiro ao sexto estágio. As UFCs isoladas nas placas do primeiro e segundo estágio devem ser contadas em números absolutos sem conversão dos valores encontrados.

Para a conversão da quantidade de colônias do terceiro ao sexto estágio, Andersen (1958) sugeriu utilizar a tabela de conversão denominada “*Positive hole conversion table*”, baseada no princípio de que com o aumento do número de partículas viáveis sendo impactadas em uma determinada placa, a probabilidade da próxima partícula passar por um orifício vazio diminui. O autor cita como exemplo, quando em 10 orifícios da placa, nove orifícios receberem uma ou mais partículas, a próxima partícula teria apenas uma chance em 10 de passar por um orifício vazio para atingir o próximo estágio. Cada placa do estágio do Andersen contém 400 orifícios, que vão diminuindo de diâmetro a cada estágio.

Para elaboração dessa tabela, o autor usou uma fórmula de Feller (FELLER, 1950 apud ANDERSEN, 1958), assumindo que o fluxo de partículas viáveis é interrompido quando uma partícula entra no orifício. Nessa fórmula, usada para elaboração da tabela de conversão, teve como variáveis o número esperado de partículas viáveis e a quantidade de perfurações do estágio, no caso 400 orifícios. Não foi considerado o tamanho dos diâmetros dos orifícios de cada estágio, apesar de haver uma diminuição progressiva de um estágio a outro. Nesse sentido, considerando que no terceiro estágio, por exemplo, o diâmetro é maior que o 4º, 5º e o 6º estágio, os microrganismos com diâmetros inferiores não ficariam retidos nos orifícios do mesmo, espera-se que passariam para os estágios subsequentes pela aerodinâmica gerada no equipamento. Ao desconsiderar tal fato, questiona-se aqui se a aplicação da tabela de conversão não poderia superestimar os resultados, visto que ao passar pelo orifício, microrganismos com diâmetros menores não interromperiam o fluxo dos demais. Entretanto ao aplicar a tabela sempre haverá um aumento do total de colônias considerando que o fluxo seria interrompido na passagem de uma partícula viável independente do seu tamanho.

Como ainda restavam dúvidas se a tabela de conversão proposta por Andersen (1958) deveria ou não ser aplicada na contagem de colônias totais do presente estudo, foi consultado o estatístico Sr. Bernardo dos Santos da Escola de Enfermagem da USP para melhor compreensão de como a tabela foi elaborada pelo autor. A tabela usando a fórmula citada no artigo de Andersen (1958) foi replicada usando o *software* R (versão 3.5). Os resultados encontrados foram divergentes de Andersen conforme apresentado no apêndice A. A título de exemplo, considerando que houve um crescimento de 300 UFC, aplicando a tabela de conversão de Andersen esse valor passaria para 555 UFC. No entanto, na versão da tabela reproduzida essa conversão deveria seria 553 UFC. Essa diferença parece pequena, mas como é progressiva chegaria a uma diferença de 199 colônias entre o resultado apresentado pelo Andersen e a tabela refeita. Dessa forma, haveria uma superestimação dos valores estabelecidos pela tabela de conversão de Andersen.

Outro ponto questionável quanto a aplicação da tabela de conversão é que o próprio autor realizou análises para verificar se haveria perdas na impactação de partículas fora da placa com meio de cultura. O amostrador de ar *six-stage Andersen sampler* foi projetado para minimizar a impactação de partículas em qualquer lugar dentro do amostrador que não o meio de cultura. Experimentos laboratoriais foram realizados para determinar a possibilidade e a extensão da perda de microrganismos viáveis para fora do meio de cultura. Para tanto, aerossóis de *Bacillus subtilis* e *Serratia marcescens*, em milhares de partículas, foram coletadas usando o *six-stage Andersen sampler*. Não foram recuperados microrganismos no interior do equipamento (fora das placas), nem na parte exterior da placa contendo o meio de cultura. No intuito de aumentar ainda mais o desafio, outro experimento foi realizado por Andersen usando uma quantidade de 22×10^{10} de microrganismos em aerossóis, sendo coletado no *six-stage Andersen sampler*. Das 47 áreas amostradas dentro do coletador de ar (em superfícies fora das placas contendo o meio de cultura) com esfregaço de *swabs*, mais de um terço das amostras foram negativas, e nas demais foram recuperadas quantidades muito baixas de 1 a 29 UFC. O autor ressaltou que apesar do desafio com uma quantidade exagerada de microrganismos, a perda desses para o interior do equipamento, fora das placas foi extremamente baixa. O que demonstrou a efetividade do fluxo aerodinâmico para impactação dos microrganismos diretamente no meio de cultura (ANDERSEN, 1958).

Para que aplicação da tabela fizesse sentido, esperava-se que houvesse uma recuperação proporcional ou aproximada da quantidade de microrganismos perdidos para o equipamento. Para uma melhor compreensão, a exemplo, se foram contadas 300 UFC e a correção estatística da tabela de conversão de Andersen indica ajustar esse valor para 555, esperava-se que 255 UFC fossem recuperadas fora da placa contendo o meio de cultura, ou seja, no interior do equipamento. Ao recuperar uma quantidade tão baixa de microrganismos no interior do equipamento em seus experimentos, mesmo usando um número exagerado de microrganismos em aerossóis, o próprio autor invalida a aplicabilidade da tabela de conversão.

Diante das colocações apresentadas, foi decidido que no presente estudo a tabela de conversão não seria utilizada. Outros estudos (BOFF *et al.*, 2013; BRUN *et al.*, 2013; HAAS *et al.*, 2010; DUAN *et al.*, 2009) que também utilizaram o *six-stage Andersen sampler* não fizeram uso da tabela de conversão sem justificarem os motivos.

4. Material e Método

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 TIPO DE ESTUDO

Esta pesquisa caracterizou-se como um estudo experimental de campo.

4.2 LOCAIS DO ESTUDO

- Centros de Material e Esterilização (CME) Classe II do Hospital Israelita Albert Einstein, com pressão negativa na área de limpeza e outro sem pressão negativa, mas com sistema de condicionamento do ar central. Este é um hospital geral terciário, privado, com 662 leitos, localizado na zona sul da cidade de São Paulo. Possui diversas creditações e certificações internacionais, entre essas: a ISO 14001 – Certificação Ambiental Institucional, com padrões de qualidade em questões ambientais e de sustentabilidade; *Joint Comission International* – Hospitalar, uma creditação americana para hospitais que verificam processos de qualidade e segurança do paciente, colaborador e ambiente.
- Laboratório de Ensaio Microbiológicos (LEM) do Departamento de Enfermagem Médico-Cirúrgica da Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo – local onde as amostras foram incubadas e as colônias, quantificadas.
- Laboratório de Microbiologia do Serviço de Infecção Hospitalar da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo da Faculdade de Ciências Médicas – serviço onde foi realizada a identificação do gênero das amostras que apresentaram crescimento microbiano.

4.3 DESCRIÇÃO DOS CME AVALIADOS NO ESTUDO

Com o intuito de verificar se a presença do sistema de ventilação com diferencial negativo de pressão do ar ambiente na área da limpeza, impacta na redução da contaminação do ar ambiente por bioaerossóis, foram avaliados os CME nas seguintes condições:

- CME 1 - Classe II com diferencial de pressão negativo do ar ambiente na área de limpeza. Este possuía antessala, como preconizado pelas normas arquitetônicas construtivas.
- CME 2 - Classe II sem diferencial de pressão negativo do ar ambiente, mas com sistema de condicionamento do ar central na área de limpeza;

Inicialmente, para seleção dos CME que participaram deste estudo foi estabelecido como critério de inclusão fazer uso do dispositivo de pré-limpeza por meio de vapor em alta pressão (Steamer®). Este é um equipamento que vem ganhando espaço na limpeza de produtos canulados, mas que provoca formação de uma névoa durante o seu uso, constituindo-se assim em um cenário desafiador para manutenção da qualidade do ar ambiente, conforme ilustrado na figura 1.

Figura 1- Equipamento de vapor em alta pressão (Steamer®) em uso na limpeza de PPS.

Fonte: Própria da autora.

As coletas de ar foram realizadas no mês de março de 2018, em ambos os CME. Durante o período da coleta de ar houve alguns dias chuvosos.

O CME com pressão negativa tem uma antessala, antes de adentrar na sala de limpeza, para que a pressão negativa seja mantida adequadamente. A sala de limpeza tem uma área de 58,00 m², a sala de preparo, 102,00 m² e o arsenal, 71,87 m². A sala de limpeza é equipada com três lavadoras ultrassônicas (durante a realização das coletas apenas uma lavadora ultrassônica foi utilizada), quatro lavadoras de jato sob pressão, também conhecidas como lavadora termodesinfetadoras, três pistolas de água sob pressão, um equipamento de vapor em alta pressão (Steamer®), quatro torneiras e quatro duchas ambas com fonte de água quente.

Antes da realização da coleta de ar na sala de limpeza do CME com pressão negativa foi verificado o funcionamento do sistema de pressão negativa com o auxílio do *Balometer*, um medidor de vazão de ar, pelos técnicos da engenharia clínica do hospital. A pressão negativa verificada nas grelhas de exaustão correspondeu a 2.01 Pa.

No CME sem pressão negativa, a sala de limpeza tem uma área de 42,60 m², a sala de preparo, 111,00 m² e o arsenal, 90,00 m². A sala de limpeza é equipada com uma lavadora ultrassônica, quatro lavadoras de jato sob pressão, três pistolas de água sob pressão, um equipamento de vapor em alta pressão (Steamer®), três torneiras e três duchas, ambas com fonte de água quente.

Ambos os CME, com e sem pressão negativa, dispõem de filtro absoluto 99,9% de filtragem no sistema de condicionamento do ar. A antessala do CME com pressão negativa dispõe de filtro bolsa classe F8. De acordo com a ABNT 7256 (2005), o filtro classe F8, é um filtro fino com eficiência de $90\% \leq Ef < 95\%$, em que Ef é a eficiência para partículas de 0,4 µm.

4.4 DESCRIÇÃO DO EQUIPAMENTO DE COLETA DE AR E OS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

Para a coleta de ar ambiente foi utilizado o dispositivo *six-stage Andersen solid impaction sampler* (Universal Electric Co, modelo 81KE14F, USA), ilustrado na figura 2. Como descrito no tópico 3.6.2 do Referencial Metodológico, esse equipamento consiste em um captador de fluxo de ar que contém seis estágios constituídos por uma placa perfurada com 400 orifícios sobre cada placa com o meio de cultura apropriado para grupos microbianos de interesse. A taxa de fluxo de ar foi de

28,3L/min. Em todas as coletas de ar o equipamento foi acionado por 20 minutos, o que correspondeu a um volume de 566 L de ar a cada coleta.

Figura 2. Ilustração do dispositivo *Six-stage Andersen solid impaction sampler*.

Fonte: a) Andersen (1958); b) e c) Própria da autora da tese.

Nota: a) Ilustração da entrada do fluxo de ar nos estágios do Andersen; b) Imagem do Andersen pronto para uso; c) Posicionamento da placa com meio de cultura no estágio do Andersen;

Os meios de cultura utilizados nas coletas foram: agar sabouraud Glicose (Probac do Brasil, placas de 90 mm, lote: P8AB9030718), seletivo para fungos; agar sangue (Probac do Brasil, placas de 90 mm, lote: P8AN9030718.A), meio rico e não seletivo indicado para recuperação de bactérias Gram positivas e negativas, além de fungos filamentosos e leveduras; lowenstein jensen agar (Probac do Brasil, placas de 90 mm, lote: PMLJA022618), meio de cultura seletivo para micobactérias; agar legionella seletivo (Probac do Brasil, placas de 90 mm, lote: PLEG9030218), meio de cultura seletivo para *Legionella* spp. Os meios de cultura *agar legionella* seletivo e *lowenstein jensen agar* foram produzidos pela empresa Probac do Brasil em placas de 90 mm, especialmente, para o presente estudo.

4.5 VALIDAÇÃO METODOLÓGICA

Antes da execução da coleta de dados foi realizada uma validação do método para testar se haveria diferença entre distribuir as placas com os diferentes meios de cultura (*agar sabouraud*, *agar sangue*, *lowenstein jensen* e *agar legionella*) nos estágios do amostrador de ar *six-stage Andersen sampler*, considerando o tamanho da partícula que seriam retidas em cada estágio, ou dispor de um único meio de cultura em todos os estágio por coleta de ar.

Essa validação fez-se necessária por considerar as seguintes implicações: (1) como primeira hipótese, considerando o tamanho das partículas e dos orifícios dos estágios do Andersen, os fungos poderiam ficar retidos nos primeiros estágios do Andersen, por sua maioria apresentar tamanho das partículas maiores que as bactérias, e nos estágios seguintes seriam depositadas as bactérias. Dessa forma, distribuir-se-ia os meios de cultura nos estágios do *six-stage Andersen sampler* na seguinte ordem: *agar sabouraud*, por ser seletivo para fungos; *agar sangue*, meio não seletivo indicado para recuperação de bactérias e fungos filamentosos e leveduras; *lowenstein jensen*, seletivo para micobactérias; e *agar legionella* seletivo. (2) Outra dúvida/hipótese era se poderia haver uma redução significativa da quantidade de microrganismos em coletas consecutivas usando um único meio de cultura em todos os estágios, o que poderia limitar o isolamento de microrganismos nas próximas coletas.

As coletas de ar para validação do método foram realizadas no Centro de Material e Esterilização da Santa Casa de São Paulo. O mesmo era equipado com duas lavadoras ultrassônica, cinco lavadoras de jato sob pressão, pistola de água sob pressão e ducha com água quente onde era realizada a limpeza manual e automatizada.

Foram distribuídas, nos 6 estágios do *Andersen*, placas de petri de 90 mm contendo o meio de cultura *Tryptic Soy Agar* (TSA). Este meio de cultura foi escolhido para a validação por ser não seletivo, favorecendo o crescimento de fungos e bactérias. Dessa forma, poderíamos verificar se haveria crescimento de fungos e bactérias em estágios específicos do Andersen para averiguar a primeira hipótese. Para verificar se em coletas consecutivas haveria redução da quantidade de bioaerossóis usando um único meio de cultura em todos os estágios, foram realizadas

quatro coletas de ar, simulando que cada coleta corresponderia a um meio de cultura específico.

O amostrador de ar *six-stage Andersen sampler* foi disposto em uma mesa carrinho auxiliar com duas prateleiras com altura de 1,28 m, posicionado próximo do local onde estava sendo realizada a limpeza dos PPS. O tempo de amostragem do ar foi de 20 minutos para cada coleta.

A quantidade de funcionários na sala de limpeza e os equipamentos em uso no momento da coleta foram controlados como variáveis para comparação da contaminação do ar.

No momento da primeira coleta estavam em funcionamento duas lavadoras ultrassônicas, realização de limpeza manual de instrumentais cirúrgicos por duas funcionárias e uma termodesinfetadora em uso, esta última, distante do ponto de coleta. Na segunda coleta, três funcionárias realizavam a limpeza manual de instrumentais e os mesmos equipamentos em uso. Na terceira coleta, duas funcionárias permaneceram na limpeza manual. Na quarta coleta, apenas uma funcionária realizava a limpeza manual e as lavadoras ultrassônicas estavam desligadas.

Ao término de cada coleta de ar, as placas com meio de cultura foram acondicionadas em caixa térmicas. As amostras foram levadas ao LEM, incubadas na estufa microbiológica (LabIncubator, modelo 2503, Fanem®, Brasil) a uma temperatura de $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 9 dias, com leitura diária das amostras com auxílio do contador eletrônico de colônias (Quimis®, modelo 02958, Brasil).

4.6 COLETA DE DADOS

A coleta de dados propriamente dita foi realizada nos CME Classe II do Hospital Israelita Albert Einstein, um com pressão negativa na área de limpeza e outro sem pressão negativa, mas com sistema de condicionamento do ar central. Como controle, foram realizadas coletas do ar exterior ao hospital, conforme recomendação da Resolução nº9/2003 da ANVISA.

As amostras do ar ambiente, tanto na sala de limpeza como na sala do preparo foram realizadas durante intenso volume de trabalho. Durante as coletas realizadas na sala de limpeza estavam em uso duchas com fonte de água quente, pistolas de

água sob pressão, equipamento de vapor em alta pressão (Steamer®), lavadora ultrassônica e lavadoras de jato sob pressão (termodesinfetadora).

A primeira coleta do dia sempre foi realizada no ambiente exterior ao hospital, seguida da coleta na sala de limpeza e por fim na sala de preparo. Nos dias em que o horário da coleta foi estendido, foi realizada uma segunda coleta do ar exterior no meio da tarde para averiguar se o nível de contaminação exterior poderia aumentar no decorrer do dia.

O equipamento *six-stage Andersen sampler* foi disposto em uma mesa carrinho auxiliar com duas prateleiras com altura de 1,0 m. Foram colocadas, nos estágios do Andersen, as seguintes placas com os meios de culturas: *agar sabouraud* Glicose (Probac do Brasil, placas de 90 mm, lote: P8AB9030718); *agar sangue* (Probac do Brasil, placas de 90 mm, lote: P8AN9030718.A); *lowenstein jensen agar* (Probac do Brasil, placas de 90 mm, lote: PMLJA022618); *agar legionella* seletivo (Probac do Brasil, placas de 90 mm, lote: PLEG9030218). Para cada coleta, um único tipo de meio de cultura foi posicionado em todos os estágios do Andersen, visto os resultados obtidos na validação metodológica, exposto no item 5.1, que evidenciaram maior crescimento microbiano no estágio 6, com crescimento também de fungos. Dessa forma, ficou evidenciado não ser adequado dispor diferentes meios de cultura por estágio.

Quanto à padronização da ordem da coleta considerando a disposição dos meios de cultura nos estágios do Andersen, foi realizada da seguinte forma: a primeira coleta foi sempre realizada colocando em todos os estágios do Andersen o meio de cultura *agar sabouraud*; a segunda coleta, com o meio de cultura *agar sangue*; a terceira, com o meio *agar legionella* seletivo; a quarta coleta, com o meio de cultura *lowenstein jensen agar*.

O tempo de amostragem do ar para cada coleta foi de 20 minutos e a taxa de vazão de 28,3 L/min.

Durante os experimentos, foram monitoradas a temperatura da sala e a umidade relativa do ar usando um termo-higrômetro digital calibrado (Incoterm, modelo 7664, China). As seguintes variáveis: atividades executadas pelos profissionais do setor, assim como o número de pessoas presentes nos ambientes durante a coleta de ar, também, foram monitoradas.

Após a coleta das amostras, as mesmas foram encaminhadas ao LEM, onde permaneceram incubadas em estufa microbiológica (LabIncubator, modelo 2503,

Fanem®, Brasil) numa temperatura de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. As placas com os meios seletivos para fungos (*agar sabouraud*) e *legionella spp* (*agar legionella* seletivo) permaneceram na estufa por até 15 dias, agar sangue por 5 dias e *lowenstein Jensen agar*, seletivo para micobactérias, por até 60 dias de incubação. Foi realizada leitura diária das amostras com contagem das colônias no contador eletrônico de colônias (Quimis®, modelo 02958, Brasil).

As placas com crescimento microbiano foram encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do Serviço de Infecção Hospitalar da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo da Faculdade de Ciências Médica para identificação do gênero e espécie quando possível.

4.7 IDENTIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS

As análises foram realizadas segundo as características fenotípicas dos microrganismos, por meio de exame macroscópico e microscópico direto da colônia, teste com o reagente azul de lactofenol (azul de algodão) e coloração de Gram para bactérias.

Foi realizada repicagem das colônias de fungos para tubos de ensaio contendo *agar sabouraud*, e após crescimento do isolado foi realizada análise microscópica.

Para análise dos fungos, em lâmina de microscopia foi colocado uma gota do reagente azul de algodão, esfregado parte da colônia a ser analisada e sobreposta uma lamínula para análise em microscópico óptico (Nikon Eclipse, modelo E100, China). O foco foi ajustado, inicialmente, para 10 vezes de aumento e depois realizado um segundo ajuste para 40 vezes de aumento.

A identificação de *Penicillium spp.* foi realizada usando o reagente azul de algodão e pela observação da cultura: crescimento rápido, branca no início tornando-se esverdeada posteriormente, apresentando superfície aveludada. Na microcultura foi realizada observação de: filamentos septados, conidióforos perpendiculares que se subdividem em ramos e fiálides em forma de “pincel”.

Para *Aspergillus spp.* também foi usado o reagente azul de algodão, observação da cultura e microcultura. Quanto a cultura, os seguintes aspectos foram observados: aspecto pulverulento devido a cabeça aspergilar, pigmentada em diversas cores - azul, verde, amarelo, preto (*A. niger*, *A. flavus*, etc). Na observação da

microcultura: hifas hialinas septadas; conidióforo longo com vesícula globosa na extremidade, coberta por fiálides, que dão origem aos conídeos.

O método de colocação de Gram foi utilizado para avaliação inicial das bactérias. Inicialmente, foi realizado um esfregaço de parte da colônia na lâmina de microscopia. Para que o esfregaço tornasse fixo na lâmina foi passado, ligeiramente, três vezes pelo bico de bunsen a parte posterior da lâmina. Em seguida, foi colocado o reagente cristal violeta por 1 minuto, e escorrido o excesso. Foi lavado com água corrente e depois adicionado a solução de lugol por 1 minuto. Novamente, foi lavado com água corrente e depois adicionado a lâmina uma solução de água-acetona ou álcool a 90% por 15 segundos. Novamente, lavado com água corrente e em seguida a lâmina foi coberta com uma solução de contraste fucsina por 30 segundos. Mais uma lavagem com água corrente e a lâmina foi seca com papel filtro sem tocar no esfregaço. Por fim, a lâmina foi examinada ao microscópico óptico (Nikon Eclipse, modelo E100, China) com objetiva de imersão, com óleo.

Pelo método de Gram, a análise das características tintoriais indica que quando as células se apresentam na cor violeta (azuladas) elas são classificadas como Gram positivas e quando se apresentam na cor da fucsina (avermelhadas), são Gram negativas.

4.8 AMOSTRAGEM

A técnica de amostragem foi não probabilística. A coleta foi realizada em quintuplicata, durante o maior volume de trabalho, tanto na área de limpeza, como na área do preparo de cada CME.

Para a amostragem do ar exterior, foi realizada uma coleta de ar por dia, com os quatro meios de cultura. Entretanto, nos dias que a coleta se estendeu, foi realizada mais uma coleta do ar exterior, no meio da tarde, para comparar se durante o decorrer do dia houve uma variação significativa de contaminação do ar exterior. Dessa forma, resultou em uma triplicata de amostras do ar exterior para cada CME avaliado.

O total de placas com os meios de cultura foram de 624, visto que foram utilizados quatro meios de cultura e para cada coleta são dispostas seis placas nos estágios do amostrador de ar Andersen.

4.9 TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Foram realizadas análises descritivas e a aplicação dos seguintes modelos:

- ANOVA três fatores – para comparação da quantidade de colônias nas salas de limpeza e preparo dos CME com e sem pressão negativa.
- Regressão linear - para avaliar a relação temperatura e umidade relativa do ar com a quantidade de UFC controlando pela sala, meio de cultura e pressão negativa, assim como para avaliar se o número de funcionários interfere na quantidade de colônias.
- Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney - para comparar a quantidade de colônias durante o uso dos diferentes equipamentos empregados para a limpeza dos PPS.

Para determinação da concentração de bioaerossóis foi utilizado a fórmula abaixo para realização dos cálculos, de Wang-Li e Simmons:

$$C = \frac{N}{Q * t}$$

Legenda:

C= concentração de bioaerossóis em UFC/m³

N= número total de colônias na amostra

Q= taxa de fluxo de amostragem do ar em m³/min

t= tempo de duração da amostragem em min

Os dados foram apresentados de forma descritiva com auxílio de gráficos e tabelas. Os resultados foram discutidos comparativamente considerando os ambientes de coleta dos dados.

4.10 ESQUEMA DA COLETA DOS DADOS DO ESTUDO

Para facilitar a compreensão do método, está apresentado na figura 3 um esquema de como aconteceu a coleta dos dados.

Figura 3. Esquema do método do estudo. São Paulo, 2018.

5. Resultados

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS DA VALIDAÇÃO

Os resultados da validação realizadas em triplicata no meio de cultura TSA estão apresentados na tabela 1 e esclareceram às dúvidas metodológicas quanto à disposição das placas com os meios de cultura em cada coleta. Os achados demonstraram maior crescimento microbiano no estágio 6, com crescimento também de fungos nesse último estágio. Dessa forma, ficou evidenciado não ser adequado dispor diferentes meios de cultura por estágio, pois o meio seletivo poderia inibir o crescimento de outros microrganismos que impactassem nesse meio, o que poderia subestimar a recuperação da contaminação do ar. A dúvida quanto a redução do número de aerossóis em coletas consecutivas também foi refutada pelos achados, uma vez que houve crescimento microbiano em todas as quatro coletas.

Tabela 1. Distribuição da quantidade da média de Unidade Formadora de Colônia (UFC) segundo os estágios do *six-stage Andersen sampler*. São Paulo, 2018.

Estágios do Andersen	Quantidade de Unidade Formadora de Colônia por coleta							
	Coleta 1		Coleta 2		Coleta 3		Coleta 4	
	Bactérias	Fungos	Bactérias	Fungos	Bactérias	Fungos	Bactérias	Fungos
Estágio 1	3	0	1	0	4	0	5	0
Estágio 2	2	0	2	0	1	0	1	0
Estágio 3	2	0	0	0	0	0	0	0
Estágio 4	2	1	5	0	1	0	1	1
Estágio 5	3	0	10	11	1	0	4	2
Estágio 6	18	5	Incontável	0	30	3	30	4
TOTAL	30	6	Incontável	11	37	3	41	7

5.2 RESULTADOS DA COLETA DE DADOS

5.2.1 Resultados de UFC

O total de UFC quantificadas em cada coleta realizada, do ambiente exterior ao hospital, as salas de limpeza e preparo de ambos os CME, com e sem pressão negativa, está apresentado no quadro 1. Também está especificada a quantidade de colônias que cresceu em cada estágio do Andersen. Neste quadro, as coletas realizadas no ambiente exterior ao hospital foram descritas relacionadas aos CME com e sem pressão negativa por corresponder ao comparativo das amostragens de ar exterior realizadas nos mesmos dias das coletas interiores descritas no quadro 1.

Não houve crescimento nos meios de cultura *agar legionella* e *lowenstein Jensen*, seletivos para *Legionella spp.* e *Mycobacterium tuberculosis*, respectivamente.

Quadro 1. Distribuição do número de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas por estágios do air six-stage Andersen sampler segundo os meios de cultura e os locais das coletas realizadas: no ambiente exterior ao hospital e nas salas de limpeza e preparo dos CME, com e sem pressão negativa. São Paulo, 2018.

Meios de cultura	Agar sabouraud		Agar sangue	
CME	CME sem pressão negativa	CME com pressão negativa	CME sem pressão negativa	CME com pressão negativa
Coleta exterior				
CE ₁ /E ₁	15	14	20	8
CE ₁ /E ₂	27	18	22	3
CE ₁ /E ₃	34	28	32	4
CE ₁ /E ₄	38	23	33	9
CE ₁ /E ₅	67	45	32	8
CE ₁ /E ₆	43	31	44	18
Total CE1	224	159	183	50
CE ₂ /E ₁	14	8	18	8
CE ₂ /E ₂	11	3	14	12
CE ₂ /E ₃	11	11	19	11
CE ₂ /E ₄	16	31	58	14
CE ₂ /E ₅	20	42	60	11
CE ₂ /E ₆	59	43	50	5
Total CE2	131	138	219	61
CE ₃ /E ₁	13	11	10	14
CE ₃ /E ₂	23	9	11	23
CE ₃ /E ₃	34	9	10	26
CE ₃ /E ₄	31	6	7	20
CE ₃ /E ₅	69	26	20	33
CE ₃ /E ₆	51	28	36	2
Total CE3	221	89	94	118

Continuação				
Meios de cultura	Agar sabouraud		Agar sangue	
CME	CME sem pressão negativa	CME com pressão negativa	CME sem pressão negativa	CME com pressão negativa
Coleta na sala de limpeza				
CISL ₁ /E ₁	26	17	20	16
CISL ₁ /E ₂	18	18	13	15
CISL ₁ /E ₃	18	21	7	8
CISL ₁ /E ₄	26	15	26	11
CISL ₁ /E ₅	34	17	12	6
CISL ₁ /E ₆	40	16	53	125
Total CISL ₁	162	104	131	181
CISL ₂ /E ₁	10	9	15	7
CISL ₂ /E ₂	22	12	22	15
CISL ₂ /E ₃	29	13	11	8
CISL ₂ /E ₄	20	12	28	9
CISL ₂ /E ₅	43	19	26	16
CISL ₂ /E ₆	43	18	37	44
Total CISL ₂	167	83	139	99
CISL ₃ /E ₁	5	6	2	9
CISL ₃ /E ₂	6	14	6	3
CISL ₃ /E ₃	12	9	2	9
CISL ₃ /E ₄	6	6	5	4
CISL ₃ /E ₅	19	3	14	19
CISL ₃ /E ₆	28	5	4	9
Total CISL ₃	76	43	33	53
CISL ₄ /E ₁	15	8	11	5
CISL ₄ /E ₂	11	4	15	7
CISL ₄ /E ₃	15	3	7	5
CISL ₄ /E ₄	47	27	8	4
CISL ₄ /E ₅	28	1	34	3
CISL ₄ /E ₆	64	4	34	5
Total CISL ₄	180	47	109	29
CISL ₅ /E ₁	16	0	5	11
CISL ₅ /E ₂	47	14	0	3
CISL ₅ /E ₃	31	6	4	4
CISL ₅ /E ₄	36	8	1	3
CISL ₅ /E ₅	37	10	11	16
CISL ₅ /E ₆	21	16	4	10
Total CISL ₅	188	54	25	47
Coleta na sala de preparo				
CISP ₁ /E ₁	16	8	6	4
CISP ₁ /E ₂	14	18	9	10
CISP ₁ /E ₃	13	21	5	8
CISP ₁ /E ₄	11	17	1	11
CISP ₁ /E ₅	28	17	10	6
CISP ₁ /E ₆	40	9	32	5
Total CISP ₁	122	90	63	44
CISP ₂ /E ₁	11	11	15	13
CISP ₂ /E ₂	12	12	24	12
CISP ₂ /E ₃	12	17	15	16
CISP ₂ /E ₄	18	14	11	5
CISP ₂ /E ₅	37	10	300	12
CISP ₂ /E ₆	23	13	28	35
Total CISP ₂	113	77	393	93

Continuação				
Meios de cultura	Agar sabouraud		Agar sangue	
CME	CME sem pressão negativa	CME com pressão negativa	CME sem pressão negativa	CME com pressão negativa
Coleta na sala de preparo				
CISP ₃ /E ₁	13	3	6	5
CISP ₃ /E ₂	9	7	4	8
CISP ₃ /E ₃	3	15	6	10
CISP ₃ /E ₄	15	21	1	8
CISP ₃ /E ₅	34	17	11	13
CISP ₃ /E ₆	24	6	22	13
Total CISP3	98	69	50	57
CISP ₄ /E ₁	11	6	8	6
CISP ₄ /E ₂	10	4	6	2
CISP ₄ /E ₃	8	3	4	2
CISP ₄ /E ₄	16	11	3	8
CISP ₄ /E ₅	17	12	10	3
CISP ₄ /E ₆	15	15	6	5
Total CISP4	77	51	37	26
CISP ₅ /E ₁	27	4	17	2
CISP ₅ /E ₂	28	3	12	2
CISP ₅ /E ₃	17	32	5	9
CISP ₅ /E ₄	39	13	15	0
CISP ₅ /E ₅	31	23	13	8
CISP ₅ /E ₆	33	9	9	4
Total CISP5	175	84	71	25

Legenda: CE: coleta de ar exterior ao hospital; CISP: Coleta de ar interior na sala de limpeza; CISP: Coleta de ar interior na sala de preparo. A numeração corresponde à sequência da coleta de amostras em cada local. A letra E após cada sigla representa o estágio do Andersen e seu respectivo número do estágio.

A concentração de bioaerossóis por m³ foi averiguada quanto à captura de fungos, conforme estabelecido na Resolução nº9/2003 da ANVISA. A concentração de bioaerossóis nas salas de limpeza e preparo do CME sem pressão negativa foi, respectivamente, de 273,15 e 206,71 UFC/m³ de fungos, enquanto no ambiente exterior ao hospital, a concentração média de bioaerossóis foi de 339,22 UFC/m³ de fungos durante as realizações da coleta neste CME. No CME com presença de pressão negativa a concentração de bioaerossóis foi de 116,96 UFC/ m³ de fungos na sala de limpeza, 131,10 UFC/ m³ na sala de preparo, e a concentração no ambiente exterior ao hospital, durante a realização das coletas neste setor, foram de 227,32 UFC/m³ de fungos.

No referente ao nível de contaminação do ar, considerando a relação I/E, em que I é a média da quantidade de fungos no ambiente interior e E, a quantidade de

fungos no ambiente exterior, obteve-se os seguintes achados: CME com pressão negativa, na sala de limpeza foi de 0,5 e na sala de preparo de 0,58; CME sem pressão negativa, nas salas de limpeza e preparo foram 0,8 e 0,6, respectivamente.

O CME com pressão negativa, conforme apresentada na tabela 2, apresentou um número estatisticamente menor de UFC, tanto na sala de limpeza quanto na do preparo quando comparado ao CME sem pressão negativa.

Tabela 2. Distribuição das medidas de tendência central das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) recuperadas segundo sala de limpeza e preparo dos CME estudados, com e sem pressão negativa, e ambiente exterior. São Paulo, 2018.

Sala	Meio de cultura	Pressão negativa	N	Média	DP	Mediana	Mínimo	Máximo
Limpeza	Agar sabouraud	Não	5	154,6	45,1	167	76	188
		Sim	5	66,2	26,3	54	43	104
	Agar sangue	Não	5	87,4	54,5	109	25	139
		Sim	5	81,8	61,2	53	29	181
Preparo	Agar sabouraud	Não	5	117,0	36,6	113	77	175
		Sim	5	74,2	15,2	77	51	90
	Agar sangue	Não	5	122,8	151,6	63	37	393
		Sim	5	49,0	28,0	44	25	93
Exterior	Agar sabouraud	Não	3	192,0	52,8	221	131	224
		Sim	3	128,7	35,9	138	89	159
	Agar sangue	Não	3	165,3	64,3	183	94	219
		Sim	3	76,3	36,5	61	50	118

A quantidade de UFC isolada no CME com pressão negativa foi estatisticamente menor ($p=0,01541$) do que o CME sem pressão negativa segundo o teste de Anova três fatores. A comparação entre a quantidade de UFC isoladas de ambos os CME está projetada no gráfico 1.

Gráfico 1. Distribuição comparativa da quantidade de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) isoladas nos meios de cultura agar sangue e agar sabouraud dos CME com e sem pressão negativa. São Paulo, 2018.

Ao realizar essa comparação considerando as salas de limpeza e preparo de ambos os CME, com e sem pressão negativa, ilustrado no gráfico 2, é possível averiguar que a quantidade de colônias cai simultaneamente na sala de limpeza e preparo quando o CME possui a pressão negativa na sala de limpeza.

Gráfico 2. Distribuição comparativa entre o nível de contaminação do ar por quantidade de UFC recuperada nos meios de cultura agar sangue e agar sabouraud nas salas de limpeza e preparo dos CME avaliados. São Paulo, 2018.

Comparando o CME com e sem pressão negativa na sala de limpeza, pelo teste de Tukey, há um aumento estimado de 52,6 da quantidade média de UFC nesta sala quando da ausência do sistema de pressão negativa. Ao comparar a sala de limpeza com a de preparo há um aumento de 6,75 em número médio de UFC de uma sala para a outra. Tanto no CME com pressão negativa, como naqueles que esse sistema está ausente, o nível de contaminação exterior, por quantidade de colônias isoladas, foi maior que o interior, conforme apresentado na tabela 3.

Tabela 3. Distribuição da estimativa do nível de contaminação do ar interior na sala de limpeza e preparo em comparação com o do exterior ao hospital. São Paulo, 2018.

Locais da coleta	Estimativa	Erro padrão	Valor t	Pr(> t)
Limpeza - Exterior	-43,08	22,27	-1,935	0,1394
Preparo - Exterior	-49,83	22,27	-2,238	0,0746
Preparo - Limpeza	-6,75	19,29	-0,35	0,9346

Quanto aos parâmetros de temperatura e umidade relativa do ar, o CME sem pressão negativa manteve uma temperatura em torno dos 18°C durante todas as coletas realizadas na sala de limpeza e a umidade relativa do ar variou de 58 a 62%, conforme apresentados na tabela 4. Na sala de preparo a temperatura mínima foi de 19,3°C e a máxima de 21,8°C e umidade relativa do ar não ultrapassou 55%. A temperatura no ambiente exterior ao hospital variou de 23,8 a 27°C, enquanto a umidade relativa do ar variou de 72 a 50%.

Tabela 4 Distribuição do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) isoladas nos meios de cultura das amostras de ar no CME sem pressão negativa e no ambiente exterior por valores de temperatura e umidade relativa do ar. São Paulo, 2018.

Local da coleta	CME sem pressão negativa				
	Amostras	Agar sabouraud	Agar sangue	Temperatura em °C	Umidade relativa %
Coleta exterior	CE1	224	183	27	50
	CE2	131	219	26,1	64
	CE3	221	94	23,8	72
Coleta na sala de limpeza	CISL1	162	131	18,9	58
	CISL2	167	139	18,7	63
	CISL3	76	33	18,8	58
	CISL4	180	109	18,8	63
	CISL5	188	25	18,1	62
Coleta na sala de preparo	CISP1	122	63	20,5	55
	CISP2	113	393	21,8	51
	CISP3	98	50	21,8	49
	CISP4	77	37	19,3	51
	CISP5	175	71	21,5	53

Legenda: CE: coleta de ar exterior ao hospital; CISL: Coleta de ar interior na sala de limpeza; CISP: Coleta de ar interior na sala de preparo. A numeração corresponde à quantidade de amostragem em cada local.

O CME com pressão negativa apresentou temperatura entre 20,7 a 21,9°C na sala de limpeza e umidade relativa de 61 a 65%. Na sala de preparo, a temperatura permaneceu em torno dos 23°C e a umidade relativa do ar entre 51 a 57% durante as coletas realizadas. A temperatura presente durante a coleta exterior chegou até 30,6°C, apresentando uma maior quantidade de unidades formadoras de colônias de fungos nessas condições climáticas, de acordo com os dados apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Distribuição do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) isoladas nos meios de cultura das amostras de ar no CME com pressão negativa e no ambiente exterior ao hospital por valores de temperatura e umidade relativa do ar. São Paulo, 2018.

Local da coleta	CME com pressão negativa				Umidade relativa %
	Amostras	Agar sabouraud	Agar sangue	Temperatura em °C	
Coleta exterior	CE1	159	50	30,6	45
	CE2	138	61	24,9	61
	CE3	89	118	22,8	79
Coleta na sala de limpeza	CISL1	104	181	21,9	63
	CISL2	83	99	20,7	65
	CISL3	43	53	21,5	62
	CISL4	47	29	20,9	61
	CISL5	54	47	20,9	63
Coleta na sala de preparo	CISP1	90	44	23,4	52
	CISP2	77	93	22,7	57
	CISP3	69	57	23,0	56
	CISP4	51	26	23,1	53
	CISP5	84	25	23,3	51

Quanto à relação de temperatura e umidade relativa do ar em comparação a quantidade de colônias, pode-se observar na tabela 6 que a cada unidade de temperatura o número de colônias aumentou em média 20,79 UFC e a cada unidade de umidade relativa do ar há um aumento em 3,77 do número de colônias em média.

Tabela 6. Distribuição das estimativas, erro padrão, valor de p e intervalos de confiança das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) isoladas nos meios de cultura nas salas de limpeza e preparo dos CME com e sem pressão negativa, segundo temperatura e umidade relativa do ar. São Paulo, 2018.

Variáveis	Estimativa	Erro padrão	Valor p	IC menor	IC maior
(Intercept)	-567,68	364,89	0,1268	-1302,60	167,24
Temperatura	20,79	9,82	0,0399	1,00	40,57
Umidade	3,77	2,26	0,1021	-0,78	8,33
Sala Limpeza	80,66	62,31	0,2021	-44,84	206,15
Sala Preparo	63,81	59,27	0,2873	-55,55	183,18
Meio.cultura Agar sangue	-22,77	16,34	0,1704	-55,69	10,15
Pressão.negativa Sim	-102,93	26,85	0,0004	-157,01	-48,84

Legenda: IC = intervalo de confiança

Na análise da quantidade de bioaerossóis em relação aos equipamentos em uso no momento da coleta, conforme apresentado no gráfico 3, não houve evidência de um deles influenciar diretamente no nível de contaminação por bioaerossóis. Como no momento da coleta vários equipamentos estavam em uso simultaneamente - considerado cenário desafiador, não é possível afirmar que um determinado equipamento influenciou diretamente na quantidade de bioaerossóis. As lavadora de jato sob pressão e as torneiras/duchas com água quente estavam em uso em todas as coletas de ar realizadas.

Gráfico 3. Distribuição da quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas nos CME com e sem pressão negativa, segundo equipamentos que estavam em uso no momento da coleta do ar. São Paulo, 2018.

Ao analisar se o número de funcionários presentes no momento da coleta nas salas de limpeza e preparo de ambos os CME, com e sem pressão negativa, interfere na contaminação do ar interior considerando a quantidade de UFC, não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,5246$). O número de funcionários de ambos os CME foram semelhantes durante as coletas de ar. O gráfico 4 apresenta a relação entre número de funcionários e presença de bioaerossóis nos CME com e sem pressão negativa.

Gráfico 4. Distribuição das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nos CME com e sem pressão negativa segundo o número de funcionários presentes no momento das coletas de ar. São Paulo, 2018.

5.2.2 Resultados microbiológicos

A maioria dos microrganismos isolados em ambos os CME foi de fungos, contrário dos resultados dos pré-testes apresentados na tabela 1. Os bioaerossóis identificados foram: *Penicillium spp.*, *Aspergillus niger*, *Rhodotorula spp.*, *Micrococcus spp.* e *Bacillus subtilis*. O termo “Não determinado” foi utilizado para descrever um microrganismo que foi isolado, mas não foi possível fazer a sua identificação quanto ao gênero. Morfologicamente o fungo em questão assemelhava-se ao gênero *Trichophyton spp* mas considerando as características quanto o seu habitat o gênero não foi considerado. Este é tipicamente um dermatófito que infecta estruturas superficiais queratinizadas, como pele e unhas. O gênero *Penicillium spp.* não foi isolado no CME sem pressão negativa. A distribuição desses microrganismos por coletas está apresentada no quadro 2. Não foram isoladas *Legionella spp.* e micobactérias nas amostras de ar coletadas.

Quadro 2. Microrganismos isolados nos Centros de Material e Esterilização com e sem pressão negativa e no ambiente exterior ao hospital. São Paulo, 2018.

MICRORGANISMOS ISOLADOS				
CME com pressão negativa			CME sem pressão negativa	
Amostras	Agar sangue	Agar sabouraud	Agar sangue	Agar sabouraud
Coleta exterior				
CE1	<i>Penicillium spp.</i> Não determinado <i>Micrococcus spp.</i> <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penicillium spp.</i> Não determinado	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Rhodotorula spp.</i> Não determinado	Não determinado
CE2	Não determinado <i>Micrococcus spp.</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Não determinado <i>Penicillium spp.</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus niger</i>	Não determinado	Não determinado
CE3	Não determinado <i>Micrococcus spp.</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus niger</i>	Não determinado	Não determinado <i>Bacillus subtilis</i>	Não determinado <i>Aspergillus niger</i>
Coleta interior na sala de limpeza				
CISL1	<i>Bacillus subtilis</i> Não determinado <i>Penicillium spp.</i> <i>Micrococcus spp.</i>	<i>Penicillium spp.</i> Não determinado	Não determinado <i>Bacillus subtilis</i>	Não determinado
CISL2	Não determinado <i>Micrococcus spp.</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Não determinado <i>Penicillium spp.</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Não determinado	Não determinado
CISL3	Não determinado <i>Micrococcus spp.</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus niger</i>	Não determinado	Não determinado <i>Micrococcus spp.</i> <i>Rhodotorula spp.</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Não determinado
CISL4	<i>Micrococcus spp.</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Rhodotorula spp.</i> <i>Penicillium spp.</i> Não determinado <i>Aspergillus niger</i>	Não determinado	Não determinado <i>Micrococcus spp.</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Não determinado <i>Bacillus subtilis</i>
CISL5	Não determinado <i>Micrococcus spp.</i> <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Penicillium spp.</i> Não determinado	Não determinado <i>Micrococcus spp.</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Não determinado
Coleta interior na sala de preparo				
CISP1	Não determinado <i>Penicillium spp.</i> <i>Micrococcus spp.</i>	Não determinado <i>Penicillium spp.</i>	Não determinado <i>Bacillus subtilis</i> <i>Rhodotorula spp.</i>	Não determinado
CISP2	<i>Bacillus subtilis</i> Não determinado <i>Micrococcus spp.</i>	Não determinado <i>Penicillium spp.</i>	Não determinado <i>Bacillus subtilis</i>	Não determinado
CISP3	<i>Micrococcus spp.</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Rhodotorula spp.</i>	Não determinado	Não determinado <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Aspergillus niger</i>
CISP4	<i>Micrococcus spp.</i> <i>Rhodotorula spp.</i> Não determinado <i>Aspergillus niger</i>	Não determinado	Não determinado <i>Bacillus subtilis</i>	Não determinado
CISP5	<i>Bacillus subtilis</i> Não determinado	<i>Penicillium spp.</i> Não determinado	Não determinado <i>Bacillus subtilis</i>	Não determinado <i>Aspergillus niger</i>

Legenda: CE: coleta de ar exterior ao hospital; CISL: Coleta de ar interior na sala de limpeza; CISP: Coleta de ar interior na sala de preparo. A numeração corresponde a amostragem da coleta em cada

local. O termo Não determinado foi utilizado para descrever um microorganismo que foi isolado, mas não foi possível fazer a sua identificação quanto ao gênero.

Quanto a sedimentação dos microrganismos nos diferentes estágios do amostrador de ar Andersen, pode-se observar no quadro 3 que apenas *Penicillium spp.* não foi isolado no estágio 6.

Quadro 3. Distribuição da sedimentação dos microrganismos isolados nas salas de limpeza e preparo dos CME com e sem pressão negativa nos diferentes estágios do Andersen. São Paulo, 2018.

Estágios do Andersen/ diâmetro das perfurações		Microrganismos isolados			
		Sala de limpeza		Sala de preparo	
		CME com pressão negativa	CME sem pressão negativa	CME com pressão negativa	CME sem pressão negativa
1	7,0µm	<i>Bacillus subtilis</i> Não determinado <i>Rhodotorula spp.</i>	<i>Bacillus subtilis</i> Não determinado	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Micrococcus spp.</i> Não determinado <i>Aspergillus niger</i>	<i>Bacillus subtilis</i> Não determinado <i>Aspergillus niger</i>
2	4,7 µm	<i>Penicillium spp.</i> <i>Micrococcus spp.</i> Não determinado	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Micrococcus spp.</i> Não determinado	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Micrococcus spp.</i> Não determinado <i>Penicillium spp.</i>	Não determinado
3	3,3 µm	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Micrococcus spp.</i> <i>Penicillium spp.</i> Não determinado	<i>Micrococcus spp.</i> <i>Bacillus subtilis</i> Não determinado	<i>Micrococcus spp.</i> Não determinado <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Bacillus subtilis</i> Não determinado
4	2,1 µm	Não determinado <i>Bacillus subtilis</i> <i>Micrococcus spp.</i> <i>Penicillium spp.</i>	Não determinado <i>Micrococcus spp.</i> <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus spp.</i> Não determinado <i>Penicillium spp.</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Rhodotorula spp.</i>	Não determinado <i>Rhodotorula spp.</i> <i>Bacillus subtilis</i>
5	1,1 µm	Não determinado <i>Bacillus subtilis</i> <i>Micrococcus spp.</i> <i>Aspergillus niger</i>	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Micrococcus spp.</i> Não determinado	<i>Micrococcus spp.</i> Não determinado <i>Bacillus subtilis</i> <i>Rhodotorula spp.</i> <i>Penicillium spp.</i>	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Aspergillus niger</i> Não determinado
6	0,65 µm	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Micrococcus spp.</i> <i>Aspergillus niger</i> Não determinado	<i>Bacillus subtilis</i> Não determinado <i>Rhodotorula spp.</i>	<i>Micrococcus spp.</i> <i>Bacillus subtilis</i> Não determinado	Não determinado <i>Bacillus subtilis</i>

6. Discussão

6 DISCUSSÃO

A presente investigação evidenciou que o sistema de pressão negativa na sala de limpeza do CME contribui para redução quantitativa do nível de contaminação do ar ambiente por bioaerossóis ($p < 0,01$), o que, a priori, confere proteção ocupacional contra doenças de origem respiratória. Entretanto, mesmo no CME sem o sistema de pressão negativa na sala de limpeza, a concentração de bioaerossóis foi menos da metade do padrão referencial estabelecido pela Resolução RE nº 9, de 16 de janeiro de 2003, da ANVISA (BRASIL, 2003), resolução esta polêmica e contestável como discutido no capítulo do referencial teórico. Nessa resolução, o valor máximo permitido para contaminação microbiana deve ser menor ou igual a 750 UFC/m³ de fungos, enquanto a concentração identificada no CME sem pressão negativa foi de 273,15 UFC/m³ de fungos e na sala de preparo ainda menor, 206,71 UFC/m³ de fungos.

Outro dado que também reforça a condução das considerações na direção da segurança microbiológica identificada no CME sem pressão negativa é a relação da contaminação interior em comparação à exterior parametrizado pela mesma Resolução RE nº 9, da ANVISA (BRASIL, 2003) que estabelece a relação I/E como $\leq 1,5$, onde I é a quantidade de fungos no ambiente interior e E, no ambiente exterior. Na presente investigação, a sala de limpeza do CME sem pressão negativa – considerado cenário desfavorável - apresentou a relação I/E de 0,8 e a sala de preparo de 0,6, bem menor que o valor de referência estabelecido de $\leq 1,5$.

Em um estudo (PEREIRA *et al.*, 2005) que avaliou a concentração de bioaerossóis em um hospital do interior do Estado de São Paulo incluiu como um dos locais de coleta do ar a sala de limpeza e de preparo do Centro de Material e Esterilização do Estabelecimento de Saúde. O sistema de ventilação desse CME era natural e a porta permanecia aberta. A concentração de bioaerossóis recuperada foi de 682 ± 62 UFC/m³ na sala de preparo e 333 ± 1 UFC/m³ na sala de limpeza. Os microrganismos identificados na sala de limpeza foram essencialmente microrganismos bacterianos quais sejam: *Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* e *S. schleiferi*. Os microrganismos isolados na sala de preparo foram: *Staphylococcus aureus*, *S. hyicus*, *S. haemolyticus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Nesse estudo, mesmo o sistema de ventilação sendo natural no CME e a porta permanecendo aberta, a concentração de bioaerossóis foi menor que o

estabelecido pela legislação vigente, Resolução RE nº9/2003 da ANVISA (BRASIL, 2003).

A Resolução RE nº 9 da ANVISA (BRASIL, 2003), considera apenas os fungos como critério para avaliação da contaminação microbiológica do ar. Como já discutido no referencial teórico do presente estudo, essa classificação determinando um padrão referencial de 750 UFC/m³ de fungos para qualidade do ar interior é bastante controversa. Isso é também retratado pelas normas internacionais, como as recomendações da OMS (2009), que direciona para presença dos fungos quando se trata de contaminação microbiológica do ar ambiente.

O CDC (2017) dos EUA reconhece as limitações na amostragem microbiológica do ar, a exemplo, da falta de padrões que vinculem os níveis de esporos fúngicos às taxas de infecção, a um nível seguro de exposição. Além disso, somasse a dificuldade de rastrear a fonte precisa de um fungo, visto que a amostragem conduzida após a exposição pode não refletir as circunstâncias que estavam ligadas no momento da contaminação, nem mesmo distinguir entre infecções adquiridas no ambiente do serviço de saúde ou na comunidade. Outro ponto é que, como os fungos se dispersam rapidamente no ambiente, os profissionais de saúde que adquirem *Aspergillus spp*, por exemplo, a infecção não pode ser confirmada ou excluída se a cepa infectante não for encontrada no ambiente do serviço de saúde, voltando para a dificuldade de rastrear a origem.

Um estudo realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo analisou a qualidade do ar em diferentes setores do hospital e a sua relação com a síndrome dos edifícios doentes (TÁVORA, 2003). Esta síndrome vem sendo relacionada ao aparecimento de sinais e sintomas decorrentes de uma má qualidade do ar, entretanto, bastante questionável devido à falta de objetividade para definição do diagnóstico com sintomatologia pouco específica. Uma das análises realizadas nesse estudo verificou a relação entre concentração de fungos, sinais e sintomas relacionados ao trato respiratório (coriza, congestão, ressecamento e prurido nasal, dispneia, tosse, rinite, entre outros), ao sistema nervoso central (cefaleia, dificuldade de concentração, tontura, sonolência, insônia e nervosismo), cutâneos (ressecamento ou prurido cutâneo, exantema e ressecamento capilar), oculares (ardor, lacrimejamento, ressecamento, turvação visual, prurido e edema ocular) e sinais e sintomas gerais, como fadiga, febre e náuseas. Nas áreas que apresentaram concentração de esporos de fungos menor ou igual a 750 UFC/m³,

81,6% dos entrevistados referiram queixas, enquanto, nas áreas com concentração de esporo fúngicos maior que 750 UFC/m³, 100% dos entrevistados referiram sinais e sintomas. Entretanto, não foram identificadas diferenças estatísticas significativas ($p=0,06$). As entrevistas foram realizadas com funcionários atuantes nas áreas estudadas e pacientes internos.

Nesse estudo de Távora (2003), foi considerada controversa a classificação de um ambiente seguro ou não considerando apenas a concentração de fungos, diante da elevada incidência de queixas em áreas com concentração de esporos fúngicos menor que o estabelecido pela Resolução RE nº 9/2003 da ANVISA. É posto como dificuldade para se determinar níveis referenciais que classifique a qualidade do ar como segura, a existência de vários fatores. Entre esses fatores estão a dificuldade em estabelecer concentrações de contaminantes fúngicos que põem em risco a saúde dos ocupantes desses ambientes, a variabilidade da concentração de fungos no ar e as características próprias dos ocupantes do ambiente interno.

Os riscos à saúde de fungos transportados pelo ar estão, principalmente, ligados a disseminação em enfermarias contendo pacientes imunocomprometidos, em que espécies de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Cryptococcus* entre outros são potencialmente ameaçadores às vidas desses pacientes. Em pessoas saudáveis trabalhando em ambientes internos, a exposição a fungos e seus esporos pode desencadear agravos à saúde por reações de hipersensibilidade, como rinite, asma e sinusite. Os fungos associados a tais reações e que podem ser isolados comumente no ambiente interior incluem espécies de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Alternaria* (HANDIN *et al.*, 2003; TANG, 2009). Indivíduos saudáveis tem a possibilidade de sensibilização e indução a uma alergia clinicamente sintomática por inalação de esporos e outros componentes de mofo, a exemplo do micélio (HURRAB *et al.*, 2017).

Em comparação a outros alérgenos ambientais, estima-se que o potencial de sensibilização por fungos seja baixo. Alguns estudos consideram o crescimento de fungos no interior como um risco potencial à saúde, mesmo não havendo evidências de associação quantitativa ou causal entre a ocorrência de espécies de fungos e os efeitos à saúde. Há evidências suficientes da associação de fungos e danos à saúde apenas para a aspergilose broncopulmonar alérgica, doenças respiratórias alérgicas, asma (manifestação, progressão e exacerbação), rinite alérgica, alveolite alérgica exógena e infecções do trato respiratório/bronquite. Entretanto, para indivíduos

saudáveis o risco de infecção por fungos dispersos no ambiente interior é baixo (HURRAB *et al.*, 2017).

De acordo com o *guideline* “*Medical diagnostics for indoor mold exposure*” elaborado por sociedades médicas alemãs e austríacas (HURRAB *et al.*, 2017), a maioria das espécies de fungos é classificada no grupo de risco 1 e apenas as espécies de *Aspergillus fumigatus* e *A. flavus*, no grupo de risco 2. O grupo de risco 1 corresponde aos agentes biológicos que provavelmente não causam doenças em humanos, enquanto no grupo de risco 2 estão os agentes biológicos que podem causar doenças a seres humanos e pode ser um perigo à saúde dos trabalhadores, mas que a dispersão para a população em geral é improvável e existem medidas preventivas eficazes e tratamento.

No presente estudo, todos os agentes biológicos identificados podem ser considerados como não patogênicos, por não causar doenças em indivíduos saudáveis. Os microrganismos isolados do ar foram *Penicillium spp.*, *Aspergillus niger*, *Rhodotorula spp.*, *Bacillus subtilis*, e *Micrococcus spp.* Observou-se que o CME com pressão negativa apresentou uma variedade maior de microrganismos em cada coleta em comparação ao CME sem pressão negativa. *Penicillium spp.* não foi isolado no CME sem pressão negativa.

O gênero *Penicillium spp.* é um fungo filamentoso amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado no ar ambiente, solo, alimentos, madeira, papel, tinta, materiais de construção, sistema de ventilação em salas de isolamento e ar condicionados, entre outros. Os esporos de *Penicillium spp.* estão na forma de bioaerossol no ar, sendo um contaminante comum em edifícios. É um dos principais produtores de micotoxinas. A inalação dos esporos presentes em ambientes de trabalho e edifícios em geral pode produzir sensibilização e alergias, como patógeno oportunista em pessoas imunocomprometidas pode causar pneumonias, endoftalmite, otomicose, endocardite e infecção. Este fungo não está classificado no grupo de risco à saúde, estabelecido pelo Instituto da Espanha (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2017). Em estudos realizados no ambiente hospitalar, *Penicillium spp.* esteve entre os gêneros de fungos predominantes isolados (ABBASI; SAMAEI, 2018; GONÇALVES *et al.*, 2018; TÁVORA, 2003).

O *Aspergillus niger*, tais como outras espécies desse gênero, produz uma quantidade abundante de conídios que são facilmente aerossolizados. Ao serem inalados e adentrar os pulmões, os macrófagos alveolares são capazes de fagocitar

e destruir esses conídios. Em pacientes imunocomprometidos por apresentar uma reduzida capacidade de conter o inóculo, os conídios podem germinar, produzindo hifas que se desenvolvem nos pulmões ou invadir vasos sanguíneos (BROOKS *et al*, 2012).

Um estudo coletou amostras microbiológicas do ar com o amostrador MAS-100 em vários hospitais na Cracóvia, Polônia, no período de 2007 a 2013. As coletas foram realizadas, principalmente, em locais que possuíam pacientes imunocomprometidos internos. A microbiota aérea continha várias espécies de fungos, sendo a maioria do gênero *Aspergillus*. Os fungos foram submetidos a avaliação de citotoxicidade por meio do ensaio colorimétrico MTT, sendo a menor citotoxicidade identificada na espécie do fungo *Aspergillus niger* (GNIADK *et al*, 2017).

Os fungos do gênero *Rhodotorula* são comuns no ar, são considerados com baixa taxa de virulência e fatalidade. Em pacientes imunocomprometidos foram identificados somente alguns casos desse microrganismo, sendo considerado como patogênico oportunista (ANATOLIOTAKI *et al.*, 2003).

Contrariamente, aos microrganismos discutidos até então de origem fúngica, o *Bacillus subtilis* é uma bactéria Gram-positiva com a capacidade de formar esporos. Em virtude desse bacilo ser um formador de esporos consegue sobreviver no ambiente por anos. O *Bacillus subtilis* pode ser encontrado no ar, no solo, na água e na vegetação. Ocasionalmente, pode causar doenças em indivíduos imunocomprometidos (BROOKS *et al.*, 2012).

Bioaerossóis com *Bacillus subtilis* têm sido isolados em estudos realizados com amostragem do ar interior em ambientes hospitalares (ASIF *et al.*, 2018; TANG; WAN, 2013). Ambos os estudos, de Asif e colaboradores (2018) e Tang e Wan (2013), isolaram tanto *Bacillus subtilis*, quanto *Micrococcus* em bioaerossóis dispersos em diferentes ambientes do hospital. No estudo de Asif e colaboradores (2018) dentre as bactérias, os cocos Gram-positivos *Micrococcus* estiveram entre os gêneros frequentemente isolados no ar, principalmente, no ambulatório do hospital, seguido do setor de emergência. No estudo de Tang e Wan (2013), o *Bacillus subtilis* foi o microrganismo mais isolado, estando presentes em todos os locais do centro cirúrgico estudado, entretanto em maior quantidade na sala do pós-operatório.

No presente estudo, foi realizada além da análise da qualidade interior do ar quanto ao nível de contaminação por fungos e bactéria em geral, análises específicas para *Legionella* e micobactéria, visto os riscos à saúde ocupacional. Como no CME

contém fonte de água quente, seja por meio das torneiras, lavadoras ultrassônicas, lavadoras de jato sob pressão e no equipamento de vapor em alta pressão (Steamer®), a investigação quanto à presença de *Legionella spp.* fez-se importante. Assim como, as micobactérias tuberculosas, considerando que produtos para saúde contaminados por este microrganismo e aerossolizados no processo de limpeza poderiam se tornar um risco à saúde dos profissionais atuantes neste setor. Entretanto, não houve crescimento de *Legionella spp.*, nem de micobactérias em nenhuma das amostras investigadas.

Inicialmente, acreditava-se que, no presente estudo, haveria um crescimento maior de bactérias em comparação aos fungos como apontados pela literatura e que ocorreu nos pré-testes desta investigação, justificado pelo fato dos produtos para saúde virem com sujidades grosseiras advindas, principalmente, do centro cirúrgico e que no processo de limpeza poderiam sofrer aerossolização. Entretanto os achados evidenciaram uma maior presença de fungos. Estes são comumente encontrados no ar interior, principalmente os esporos e conídios, pela alta resistência e fácil disseminação no ambiente, como discutido no referencial teórico desta tese.

Alguns estudos mostraram que o processo de coleta de ar de bioaerossóis bacterianos e o impacto na placa com o meio de cultura pode danificar fisicamente as paredes das células das bactérias, bem como os tempos de amostragem prolongados são uma das causas de viabilidade reduzida (TANG, 2009; HADDRELL; THOMAS, 2017).

Um estudo realizado por Lundholm (1982) fez uma comparação entre experimentos laboratoriais usando bioaerossóis de *Staphylococcus epidermidis* e *Serratia marcescens*, com experimentos de campo realizados em duas indústrias diferentes, comparando também diferentes amostradores de ar, entre eles o amostrador de ar *six-stage Andersen sampler*. Neste estudo, foi avaliada a quantidade de microrganismos viáveis e os fragmentos de membranas das paredes bacterianas, evidenciando que parte das bactérias, ao ser impactadas no meio de cultura sofrem lise celular. Na investigação, o amostrador de ar Andersen apresentou uma eficiência significativamente maior no isolamento de bioaerossóis em bactérias em relação a outros amostradores.

Outro estudo também constatou os danos a parede celular das bactérias durante as coletas de ar. *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13532 foi aerossolizada usando uma suspensão de cultura em um nebulizador e o bioaerossol foi amostrado

por um impactador AGI-30 com taxa de fluxo de 12,5 L/min. O bioaerossol foi amostrado por 60 minutos em intervalos de 15 minutos, em triplicata para cada tempo de amostragem. Os equipamentos LAS-X e Aerosizer foram utilizados para contagem de partículas no ar e dos fragmentos de 0,3 a 0,5mm de cada célula bacteriana (TERZIEVA *et al.*, 1996).

Neste estudo de Terzieva e colaboradores (1996), os achados evidenciaram que lesões da estrutura bacteriana ocorreram em todos os tempos de amostragem (15, 30, 45 e 60 minutos), entretanto sendo maiores nos tempos de 45 e 60 minutos, sendo que a taxa de sobrevivência das bactérias após 60 minutos de amostragem foi de apenas 20%. As células danificadas apresentaram perdas de funções relacionadas à membrana, tornando-as incapazes de crescer em meios de cultura, apenas algumas conseguiram se recuperar em meio de cultura não seletivo. Esse fato também foi identificado em células bacterianas não viáveis em resposta ao processo de estresse, em que a perda da capacidade das bactérias estressadas para formar colônias em meio de cultura levaram a mudanças semelhantes na integridade da membrana daquelas que tiveram lesões da membrana no impacto. Dessa forma, a contagem de unidades formadoras de colônias bacterianas pode ser subestimada.

Por outro lado, os fungos e seus esporos são mais resistentes, sendo capazes de resistir a maiores tensões devido à desidratação e reidratação, extremos de temperatura, bem como radiação da luz ultravioleta. Ao contrário das bactérias e vírus, a maioria dos fungos é capaz de disseminar os seus esporos a longas distâncias. Esse fato é originado desde a evolução e seleção natural ao longo de milhões de anos em que os fungos projetaram seus esporos para serem capazes de suportar as maiores adversidades ambientais (TANG, 2009).

Os bioaerossóis capturados pelo amostrador de ar *six-stage Andersen sampler* em ambos os CME do presente estudo, foram sedimentados em maior quantidade nos estágios 5 e 6, quando comparado aos demais estágios. Esse equipamento foi projetado representando o sistema respiratório humano, em que o tamanho dos orifícios diminui a cada estágio, fazendo com que as partículas se depositem nas placas com os meios de cultura dependendo das suas dimensões aerodinâmicas ou siga para o próximo estágio. Os estágios representam o trato respiratório humano, em que as maiores partículas ficam retidas no trato respiratório superior, no caso do equipamento, nos primeiros estágios, enquanto as menores são capazes de adentrar aos alvéolos pulmonares (ANDERSEN, 1958)

Com base no tamanho dos orifícios do Andersen, a cada estágio representando o sistema respiratório humano, pode-se afirmar que a maioria dos bioaerossóis isolados no presente estudo conseguiriam adentrar ao trato respiratório inferior, atingindo os brônquios terminais e alvéolos pulmonares. Entretanto, considerando que todos os microrganismos isolados são classificados como não patogênicos em indivíduos saudáveis, provavelmente, não conseguiriam causar danos à saúde, sendo eliminados pelos mecanismos protetores do trato respiratório ou pelo sistema imunológico. Os esporos de *Penicillium spp.*, isolados no CME com pressão negativa, poderiam desencadear sensibilização e alergias. Este é um contaminante comumente encontrado em edifícios, domicílios, hospitais e no ambiente em geral.

Quanto à temperatura, a RDC nº15 da ANVISA (BRASIL, 2012) determina que na sala de limpeza do CME seja mantida uma temperatura ambiente entre 18° a 22°C. Não há indicação de parâmetros quanto à umidade relativa do ar. Os CME com e sem pressão negativa, do presente estudo, mantiveram a temperatura dentro dos parâmetros exigidos pela RDC nº15 da ANVISA de 2012. O CME sem pressão negativa manteve a temperatura em torno dos 18°C na sala de limpeza e o CME com pressão negativa apresentou temperatura entre 20,7 a 21,9°C.

De acordo com o manual da Organização Mundial da Saúde (2009), a umidade relativa do ar pode ser tratada como um indicador de risco para a saúde, visto que o excesso de umidade em quase todos os ambientes internos leva ao crescimento microbiano, como fungos e bactérias, além de iniciar a degradação química ou biológica de materiais, que também poluem o ar interior.

Em relação aos equipamentos em uso no momento da coleta, não houve evidência de um deles influenciar diretamente no nível de contaminação por bioaerossóis. Essa falta de correlação deve ter sido influenciada pelo fato de vários equipamentos estavam em uso simultaneamente no momento da coleta e não ter sido feita uma comparação do nível de contaminação antes e depois do uso desses, para averiguar se houve aumento da concentração de microrganismos após o uso de determinado equipamento. Dessa forma não é possível inferir que um determinado equipamento influenciou diretamente na quantidade de bioaerossóis.

Outra falta de correlação, no presente estudo, foi a quantidade de funcionários em relação ao número de bioaerossóis, provavelmente, pelo número de pessoas em ambos os CME ter sido bem semelhante durante as coletas de ar. A influência do

número de pessoas e atividades humanas no aumento da contaminação aérea por microrganismos já é bem evidenciada na literatura (HEO *et al.*, 2017).

7. Conclusão

7 CONCLUSÃO

Os achados da presente investigação evidenciaram que o sistema de pressão negativa na sala de limpeza do CME contribuiu para redução quantitativa de bioaerossóis, tanto nesse ambiente como na sala de preparo. O número de bioaerossóis isolado do CME com pressão negativa foi estatisticamente ($p=0,01541$) menor do que o CME sem pressão negativa. Na sala de limpeza do CME com pressão negativa a média da concentração de bioaerossóis foi de 116,96 UFC/m³ de fungos, enquanto na sala de preparo, 131,10 UFC/m³ de fungos. O nível de contaminação do ar por fungos considerando a relação I/E foi de 0,5 e 0,58 nas salas de limpeza e preparo, respectivamente.

Por outro lado, mesmo no CME sem esse sistema de tratamento do ar na sala de limpeza, a concentração média de bioaerossóis foi menos da metade (273,15 UFC/m³ de fungos) do padrão referencial estabelecido pela Resolução nº 9/2003 da ANVISA, em que o valor máximo permitido deve ser ≤ 750 UFC/m³ de fungos, embora haja questionamentos sobre as recomendações dessa resolução. Na sala de preparo, a média de concentração de bioaerossóis foi ainda menor, 206,71 UFC/m³ de fungos. No referente ao nível de contaminação do ar por fungos, considerando a relação I/E no CME sem pressão negativa foi de 0,8 na sala de limpeza e 0,6 na sala de preparo, também, bem menor que o parâmetro estabelecido pela Resolução nº 9/2003 da ANVISA de $\leq 1,5$.

Ressalta-se que a quantidade e tipo de microrganismos existentes em qualquer ar ambiente é circunstancial, instável e principalmente dependente dos disseminadores microbianos presentes no local, sejam pessoas ou atividades. Nesse sentido, não se condena conclusivamente CME que não dispõe de pressão negativa na sala de limpeza configurando risco ocupacional. Microrganismos de transmissão aérea, reconhecidamente patogênico como *Legionella* spp e *Mycobacterium tuberculosis* não foram recuperados na presente investigação.

Referências

REFERÊNCIAS

- ABBASI, F.; SAMAEI, M.R. The effect of temperature on airborne filamentous fungi in the indoor and outdoor space of a hospital. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0939-5>
- AMERICAN INSTITUTE OF ARCHITECTS (AIA). Guidelines for design and construction of hospital and health care facilities. AIA: Washington, 2001.
- AMERICAN SOCIETY OF HEATING, REFRIGERATING, AND AIR-CONDITIONING ENGINEERS (ASHRAE). HVAC Design manual for hospital and clinics. 2.ed., Atlanta (ESA). ASHRAE, 2013.
- ANATOLIOTAKI, M.; MANTADAKIS, E.; GALANAKIS, E., SAMONIS, G. Rhodoturula species fungemia: a threat to the immunocompromised host. *Clin. Lab.*, v.49, p.49-55., 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12593475>
- ANDERSEN, A.A. New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. *Journal of bacteriology*, v.76, n.5, p.471-484, 1958. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC290224/pdf/jbacter00507-0033.pdf>
- ASIF, A.; ZEESHAN, M.; HASHMI, I. *et al.* Microbial quality assessment of indoor air in a large hospital building during winter and spring season. *Building and Environment*, v.135, p. 68-73, 2018. Doi.org/10.1016/j.buildenv.2018.03.010.
- ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION - AAMI. ANSI/AAMI ST79:2017 Comprehensive guide to steam sterilization and sterility assurance in health care facilities. AAMI, 2017.
- ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION (AAMI). Comprehensive guide to steam sterilization and sterility assurance in health care facilities. AAMI, 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT NBR 7256. Tratamento de ar em estabelecimentos assistenciais de saúde (EAS) – Requisitos para projeto e execução das instalações. ABNT, 2005.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT/CB-055. Projeto de revisão ABNT NBR 7256 Mar 2018. Projeto em Consulta Nacional. ABNT, 2018.
- BAUER, H.; SCHUELLER, E.; WEINKE, G. *et al.* Significant contributions fungal spores to the organic carbon and to the aerosol mass balance of the urban atmospheric aerosol. *Atmospheric Environmental*, v.42, n.22, p.5542-49, 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1352231008002781>
- BOFF, C.; ZOPPAS, B.C.; AQUINO, V.R *et al.* The indoor air as a pontencial determinant of the frequency of invasive aspergillosis in the intensive care. *Mycoses*, v.56, n.5, p.527-31, 2013. Doi: 10.1111/myc.12070.
- BOLLIN, G.E.; PLOUFFE, J.E.; PARA, M.F.; HACKMAN, B. Aerosols containing Legionella pneumophila generated by shower heads and hot-water faucets. *Appl.*

Environ. Microbiol., v.50, n.5, p. 1128-1131, 1985. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC238711/>

BRASIL – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº9, de 16 de janeiro de 2003. Padrões Referenciais de Qualidade do Ar Interior, em ambientes climatizados artificialmente de uso público e coletivo Brasília: Anvisa, 2003.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Cartilha de proteção respiratória contra agentes biológicos para trabalhadores de saúde. Brasília: Anvisa, 2006.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Cartilha de proteção respiratória contra agentes biológicos para trabalhadores de saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasília: Anvisa, 2009.

BRASIL - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº15 de março de 2012. Dispõe sobre requisitos de boas práticas para o processamento de produtos para saúde e dá outras providências. Ministério da Saúde – Brasília: ANVISA, 2012.

BRASIL - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC Nº55 de novembro de 2012. Dispõe sobre os detergentes enzimáticos de uso restrito em estabelecimentos de assistência à saúde com indicação para limpeza de dispositivos médicos e dá outras providências. Ministério da Saúde – Brasília: ANVISA, 2012.

BRAYMEN, D.T. Survival of micro-organisms in aerosols produced in cleaning and disinfecting. Public Health Reports; v.84, n.6, p.547-552. 1969

BROOKS, G.F.; CARROLL, K.C.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A.; MIETZNER, T.A. Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg. – 25. Ed. – Porto Alegre: AMGH, 2012.

BRUN, C.P.; MIRON, D.; SILLA, L.M.; PASQUALOTTO, A.C. Fungal spore concentration in two haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) units containing distinct air control systems. Epidemiol Infect, v.141, n.4, p.875-9, 2013. Doi: 10.1017/S0950268812001124.

BURILLO, A.; PEDRO-BOTET, M.L.; BOUZA, E. Microbiology and epidemiology of Legionnaire's disease. Infect Dis Clin N Am, v.31, p.7-27, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28159177>

CAMARGO, T.C; ALMEIDA, A.G.C.S; BRUNA, CQM *et al.* Manual and Automated Cleaning Are Equally Effective for the Removal of Organic Contaminants From Laparoscopic Instruments. Infection Control and Hospital Epidemiology, v.1, p.1-6, 2017.

CARREIRO, D.M; VASCONCELOS, L; AYOUB, M.E. Síndrome fúngica, uma epidemia oculta. -1ªEdição – São Paulo: Editora Referência Ltda, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. Guidelines for environmental infection control in health-care facilities (2003). Recommendations from

CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC): Chicago, EUA, versão atualizada em 2017(a). Disponível em: <https://wwwdev.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/environmental/index.html>.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. 2007 Guideline for isolation precautions: preventing transmission of infectious agents in healthcare sittings. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC): Chicago, EUA, versão atualizada em 2017(b). Disponível em: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/isolation/index.html>

DUAN, H. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. Environ Res, v.109, n.5, p.511-7, 2009. Doi: 10.1016/j.envres.2009.02.014.

FRÖHLICH-NOWOISKY, J. et al. High diversity of fungi in air particulate matter. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, v.106, n.31.p.12814-19, 2009. Disponível em: <http://www.pnas.org/content/pnas/106/31/12814.full.pdf>

DEUS FILHO, A. Chapter 2 - Coccidioidomycosis. J. bras. Pneumol., v.35, n.9, p.920-930, 2009. Disponível em: http://www.scielo.br/pdf/jbpneu/v35n9/en_v35n9a14.pdf

GNIADEK, A.; KRZYSCIAK, P.; TWARUZEK, M.; MACURA, A.B. Occurrence of fungi and cytotoxicity of the species: *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus fluvus* isolated from the air of hospital wards. International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health, v.30, n.2, p.231-239, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28366953>

GONÇALVES, C.L. et al. Airborne fungi in an intensive care unit. Braz. J. Biol., v.78, n.2, p. 265-270, 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/bjb/v78n2/1519-6984-bjb-1519-698406016.pdf>

HAAS,D.; GALLER, H.; HABIB, J. *et al.* Concentration of viable airborne fungal spore and trichloroanisole in wine cellars. Int J Food Microbiol, v.144, n.1, p.126-32, 2010. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.008.

HADDRELL, A.E.; THOMAS, R.J. Aerobiology: experimental considerations, observations, and future tools. Appl. Environ. Microbiol., v.83:e00809-17, 2017. Disponível em: <https://aem.asm.org/content/83/17/e00809-17>

HANDIN, B.D; KELMAN, B.J; SAXON, A. Adverse human health effects associated with molds in the indoor environment. J. Occup. Environ. Med., v.45, n.5, p.470-8, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12762072>

HEO, K.J; LIM, C.E.; KIM, H.B.; LEE, B.U. Effects of human activities on concentrations of culturable bioaerosols in indoor air environments. Journal of Aerosol Science, v.104, p.58-65; 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002185021630218X>

HURRAB, J. et al. Medical diagnostics for indoor mold exposure. International Journal of Hygiene and Environmental Health, v.220, p. 305–328, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27986496>

INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO. *Penicillium* spp. DATABio, España, 2017. Disponível em: <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Penicillum%20spp%202017.pdf>

JENSEN, P.A.; TODD, W.F.; DAVIS, G.N.; SCARPINO, P.V. Evaluation of eight bioaerosol samplers challenged with aerosols of free bacteria. *American Industrial Hygiene Association Journal*, v.53, n.10, 1992. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1456208>

LACERDA, T.C.; SOUZA, F.M.; PRADO, T.N. et al. Tuberculosis infection among primary health care workers. *J Bras Pneumol*. V.43, n.5, p.416-423, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29340489>

LEVINSON, W. *Microbiologia médica e imunologia*. – 10.ed. – Porto Alegre: Artmed, 2010.

LUNDHLM, M. Comparison of Methods for quantitative determinations of airborne bacteria and evaluation of total viable counts. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 44, n.1, p. 179-183, 1982. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC241987/>

MACINTYRE, A.J. *Ventilação industrial e controle da poluição*. – 2ªed. Editora Guanabara – Rio de Janeiro, 1990.

MADIGAN, M.T; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. *Microbiologia de Brock*. 12.ed – Porto Alegre: Artmed, 2010.

MADSEN, A.M; MATTHIESEN, C.B. Exposure to aerosols during high-pressure cleaning and relationship with health effects. *Ann Agric Environ Med*, v.20, n.1, p. 420-425, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24069842>

MICHELL, T.G. *Micologia médica*. In: BROOKS, GF et al. *Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg*. -25.ed.- Porto Alegre: AMGH, 2012.

OCCUPATIONAL SAFETY & HEALTH ADMINISTRATION (OSHA). *Hospital investigations: health hazards*. Technical manual, section VI: chapter 1. Disponível em: https://www.osha.gov/dts/osta/otm/otm_vi/otm_vi_1.html

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS) – WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Natural ventilation for infection control in health-care settings*. WHO Publication/Guidelines, 2009. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/natural_ventilation.pdf

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS) – WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Infection prevention and control epidemic – and pandemic prone acute respiratory infections in health care*. WHO Guidelines, 2014. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112656/9789241507134_eng.pdf;jsessionid=89D60861BD32EAC4342EABA1182272A8?sequence=1

O'TOOLE, J.; KEYWOOD, M.; SINCLAIR, M.; LEDER, K. Risk in the mist? Deriving data to quantify microbial health risks associated with aerosol generation by water-

efficient devices during typical domestic water-using activities. *Water Sci Technol*, v.60, n.11, p.2913-2920, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19934513>

PEREIRA, R.G. et al. Bioaerossóis bacterianos em um hospital. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 26, n. 1, p. 77-81, 2005. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/68627/2-s2.0-33745639027.pdf?sequence=1>

PRINCIPE, L.; TOMAO, P.; VISCA, P. Legionellosis in the occupational setting. *Environmental Research*, v.152, p. 485-495, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27717486>

ROY, C.J.; MILTON, D.K. Airborne transmission of communicable infection – The elusive pathway. *N Engl J Med*, v.350, n.17, p.1710-12, 2004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15102996>

RUTALA, W.A; WEBER, D.J.; HEALTHCARE INFECTION CONTROL PRACTICES ADVISORY COMMITTEE (HICPAC). Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities, 2008. Center for Disease Control and Prevention (CDC) – Atlanta, EUA; 2008. Disponível em: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/disinfection-guidelines.pdf>

SHORT, C.A.; AL-MAIYAH, S. Design strategy for low-energy ventilation and cooling of hospitals. *Building Research & Information*, v.37, n.3, p.264-292, 2009. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/09613210902885156?needAccess=true>

SILVA, A. Organização do Centro de Material e Esterilização. In: GRAZIANO, K.U.; SILVA, A.; PSALTIKIDIS, E.M. *Enfermagem em Centro de Material e Esterilização*. Barueri, SP: Manole, 2011.

SILVA, C.L.C.; HANSEN, L.L.; ALMEIDA, A.G.C.S. *et al.* Negative pressure of the environmental air in the cleaning area of the materials and sterilization center: a systematic review. *Rev Latino-Am Enfermagem*, v.24, p.e2781, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rlae/v24/0104-1169-rlae-24-02781.pdf>

SINGH, P., RAMESHWARAM, N.R., GHOSH, S., MUKHOPADHYAY, S. Cell envelope lipids in the pathophysiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiology*, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29771143>

STOECKER, WF; JONES, JW. *Refrigeração e ar condicionado*. Tradução José M. Saiz Jabardo, et al. – São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1985.

TANG, J.W. The effect of environmental parameters on the survival of airborne infectious agents. *J. R. Soc. Interface*, n.6, S737–S746, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19773291>

TANG, C.S.; WAN, G.H. Air quality monitoring of the post-operative recovery room and locations surrounding operating theaters in a Medical Center in Taiwan. *PLOS ONE*, v.8, n.4, p. e61093, 2013. Doi:10.1371/journal.pone.0061093.

TÁVORA, L.G.F. Qualidade do ar do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e sua relação com a síndrome dos edifícios doente. [Tese]. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: São Paulo, 2003.

TERZIEVA, S.; DONNELLY, J.; ULEVICIUS, V. *et al.* Comparison of methods for detection and enumeration of airborne microorganisms collected by liquid impingement. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.62, n.7, p.2264-2272, 1996. Disponível em: <https://aem.asm.org/content/62/7/2264>

THOMAS, R.J. Particle size and pathogenicity in the respiratory tract. *Virulence*, v.4, n.8, p. 847-858, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3925716/>

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 10.ed. – Porto Alegre: Artmed, 2012.

TURNER, A.G.; WILKINS, J.R.; CRADDOCK, J.G. Bacterial aerosolization from an ultrasonic cleaner. *J Clin Microbiol*, v.1, n.3, p.289-93, 1975. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC275061/pdf/jcm00235-0067.pdf>

XU, Z.; YAO, M. Monitoring of bioaerosol inhalation risks in different environments using a six-stage Andersen sampler and the PCR-DGGE method. *Environ Monit Assess*, 185:3993-4003, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22955887>

WANG-LI; SIMMONS. Bioaerosol measurement in animal environments. North Carolina State University. Bio&Ag ENGINEERING. (apresentação em ppt). Disponível em: pt.slideshare.net/LPELC/cpd-bioaerosol-v2.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould. The Regional Office for Europe of the World Health Organization. Germany: WHO, 2009. Disponível em: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0017/43325/E92645.pdf?ua=1

YAO, M.; MAINELIS, G. Use of portable microbial samplers for estimating inhalation exposure to viable biological agents. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, v.17, p.31-38, 2007. Doi:10.1038/sj.jes.7500517.

Appendice

APÊNDICE

A tabela abaixo foi elaborada pelo estatístico da Escola de Enfermagem da USP, Bernardo dos Santos, juntamente com a autora da tese, usando a fórmula citada no artigo de Andersen (1958) para elaboração da tabela de conversão denominada “*Positive hole conversion table*”. Abaixo, a fórmula de Feller (1950, apud ANDERSEN, 1958).

$$P_r = N \left[\frac{1}{N} + \frac{1}{N-1} + \frac{1}{N-2} + \cdots \frac{1}{N-r+1} \right]$$

Resultados obtidos utilizando a mesma fórmula citada no artigo de Andersen (1958) para elaboração da tabela de conversão. São Paulo, 2018.

r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P	r	P
1	1	46	49	91	103	136	166	181	241	226	332	271	452	316	622	361	927
2	2	47	50	92	104	137	167	182	242	227	335	272	455	317	627	362	937
3	3	48	51	93	106	138	169	183	244	228	337	273	458	318	632	363	947
4	4	49	52	94	107	139	171	184	246	229	339	274	461	319	637	364	958
5	5	50	53	95	108	140	172	185	248	230	342	275	464	320	642	365	969
6	6	51	54	96	110	141	174	186	250	231	344	276	467	321	647	366	981
7	7	52	56	97	111	142	175	187	252	232	346	277	471	322	652	367	992
8	8	53	57	98	112	143	177	188	254	233	349	278	474	323	657	368	1005
9	9	54	58	99	114	144	178	189	255	234	351	279	477	324	662	369	1017
10	10	55	59	100	115	145	180	190	257	235	353	280	480	325	667	370	1030
11	11	56	60	101	116	146	181	191	259	236	356	281	484	326	673	371	1043
12	12	57	61	102	118	147	183	192	261	237	358	282	487	327	678	372	1057
13	13	58	63	103	119	148	185	193	263	238	361	283	491	328	684	373	1071
14	14	59	64	104	120	149	186	194	265	239	363	284	494	329	689	374	1086
15	15	60	65	105	122	150	188	195	267	240	366	285	497	330	695	375	1102
16	16	61	66	106	123	151	189	196	269	241	368	286	501	331	701	376	1118
17	17	62	67	107	124	152	191	197	271	242	371	287	504	332	706	377	1134
18	18	63	68	108	126	153	193	198	273	243	373	288	508	333	712	378	1152
19	19	64	70	109	127	154	194	199	275	244	376	289	511	334	718	379	1170
20	20	65	71	110	128	155	196	200	277	245	378	290	515	335	724	380	1189
21	22	66	72	111	130	156	197	201	279	246	381	291	519	336	730	381	1209
22	23	67	73	112	131	157	199	202	281	247	384	292	522	337	737	382	1230
23	24	68	74	113	133	158	201	203	283	248	386	293	526	338	743	383	1252
24	25	69	76	114	134	159	202	204	285	249	389	294	530	339	749	384	1276
25	26	70	77	115	135	160	204	205	287	250	391	295	534	340	756	385	1301
26	27	71	78	116	137	161	206	206	289	251	394	296	537	341	763	386	1327
27	28	72	79	117	138	162	207	207	291	252	397	297	541	342	769	387	1356
28	29	73	80	118	140	163	209	208	293	253	400	298	545	343	776	388	1387
29	30	74	82	119	141	164	211	209	295	254	402	299	549	344	783	389	1420
30	31	75	83	120	142	165	212	210	297	255	405	300	553	345	791	390	1456
31	32	76	84	121	144	166	214	211	299	256	408	301	557	346	798	391	1496
32	33	77	85	122	145	167	216	212	301	257	411	302	561	347	805	392	1541
33	34	78	87	123	147	168	218	213	304	258	413	303	565	348	813	393	1591
34	35	79	88	124	148	169	219	214	306	259	416	304	569	349	820	394	1648
35	37	80	89	125	150	170	221	215	308	260	419	305	573	350	828	395	1715
36	38	81	90	126	151	171	223	216	310	261	422	306	578	351	836	396	1795
37	39	82	92	127	153	172	224	217	312	262	425	307	582	352	844	397	1895
38	40	83	93	128	154	173	226	218	314	263	428	308	586	353	853	398	2028
39	41	84	94	129	156	174	228	219	317	264	431	309	591	354	861	399	2228
40	42	85	95	130	157	175	230	220	319	265	433	310	595	355	870	400	2628
41	43	86	97	131	158	176	232	221	321	266	436	311	599	356	879		
42	44	87	98	132	160	177	233	222	323	267	439	312	604	357	888		
43	45	88	99	133	161	178	235	223	325	268	442	313	608	358	897		
44	47	89	101	134	163	179	237	224	328	269	445	314	613	359	907		
45	48	90	102	135	164	180	239	225	330	270	449	315	618	360	917		

Legenda: r – corresponde a quantidade de colônias; p – a correção da quantidade de colônias.