

PESQUISA DE FUNGOS ANEMÓFILOS EM BIOTÉRIO

RUBENS C. LOBATO*
JULIO CEZAR R. DANIELSKI**
ÉRICA S. SILVEIRA***

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo conhecer a presença fúngica no ar das instalações do Biotério Central da FURG, avaliando a contaminação fúngica antes e após o procedimento de limpeza semestral de rotina. Para este estudo, foram coletadas amostras de ar em três salas, denominadas Módulo Camundongos, Módulo Ratos I e Módulo Ratos II. As coletas foram realizadas por meio da técnica de sedimentação em placa de Petri contendo meio de cultura PDA (Accumedia®) estéril em triplicata, por um período de 10 minutos e à altura de um metro do piso. A identificação dos gêneros encontrados foi realizada por observação macroscópica das colônias, associando-se ao exame direto em lâmina. A presença fúngica foi mensurada em UFCs e calculadas as frequências em tabelas de contingência. Os gêneros *Penicillium*, *Cladosporium* e de fungos não-esporulados apresentaram maior prevalência no total de amostras.

PALAVRAS-CHAVE: Fungos anemófilos, contaminação ambiental, biotério.

ABSTRACT

Airborne fungi screening in animal house

The aim of this study was to know the presence of airborne fungi in the FURG's Central Animal House and to evaluate the fungical contamination before and after the half-yearly cleaning routine procedure. We collected samples from the air in three rooms named: Mice Module, Rats Module I and II. The collects were made through settle plate technique in PDA (Accumedia®) in triplicate during 10 minutes at the height of 1 meter from the floor. The genera identification was made through the macroscopic observation of colonies associated to direct exam slide. The fungical presence was measured in CFU's and the frequencies were shown in contingency tables. The genera *Penicillium*, *Cladosporium* and no sporulated fungi were the most prevalents.

KEY-WORDS: Airborne fungi, environmental contamination, animal house

* Acadêmico de Ciências Biológicas – FURG; rubenslobatobio@yahoo.com.br

** Biólogo, Chefe do Biotério – FURG

*** Professora do Dep. de Patologia – FURG; Mestre em Imunologia; Responsável Técnica do Biotério-FURG

INTRODUÇÃO

Os biotérios constituem-se em locais adequados e capazes de produzir e manter espécies animais destinadas a servir como reagentes biológicos em diversos tipos de ensaios controlados, para atender as necessidades dos programas de pesquisa, ensino, produção e controle de qualidade nas áreas biomédicas, ciências humanas e tecnológicas, segundo a finalidade da instituição¹. A construção de um biotério de criação tem como fator preponderante a instalação de sua infra-estrutura distante de centros urbanos, locais onde possa ser evitada a interação entre os animais e fatores ambientais desfavoráveis^{1,2}.

No que diz respeito aos aspectos ambientais dos biotérios, alguns fatores devem ser considerados. Fatores físicos, químicos e microbiológicos, associados a fatores genéticos, podem influenciar na resposta animal, assim como em seu processo reprodutivo³.

No que concerne aos fatores microbiológicos, a observância de contaminantes do ar é fundamental, em especial de organismos que têm dispersão aérea, como por exemplo, fungos de dispersão aérea (anemófilos), visto que não existem ambientes livres da presença fúngica anemófila^{4, 5}. Os fungos que têm dispersão aérea são denominados anemófilos, possuindo a capacidade de colonizar diferentes substratos e habitats de forma singular e muito eficiente^{6,9}.

Fungos anemófilos constituem os principais contaminantes no ar de ambientes fechados, podendo promover a sensibilização de indivíduos susceptíveis e o desencadear de processos alérgicos, irritação em mucosas e pele, infecções fúngicas e a exposição aos seus propágulos e metabólitos toxigênicos^{4,6,7,9-11}. Esses microorganismos são conduzidos por movimentos de ar e, no caso de salas de biotérios, pela interação entre correntes de ar originadas das gaiolas com animais, de fontes de calor, do movimento, bem como de sistemas de insuflamento e de exaustão¹. Também o manejo dos animais pode ser fonte de propagação desses organismos, através das fezes, urina, saliva ou até mesmo através de sua transmissão por aerossóis para o ambiente¹². Esse tipo de transmissão amplifica o potencial de exposição em uma área de experimentação animal, devendo ser avaliado o nível das condições de biossegurança para o trabalho com animais e os riscos de que lesões provocadas aos mesmos possam alterar e modificar resultados de estudos com animais¹.

O Biotério Central da FURG é um biotério convencional controlado de criação, conforme as normas da Confederação Brasileira de Bioterismo e Experimentação Animal (COBEA). Sua estrutura

constitui-se de módulos separados para cada espécie animal, corredor central e área de lavagem. O contato entre esses ambientes se dá por meio de barreiras de segurança, onde os profissionais utilizam procedimento asséptico e paramentação. Os mecanismos que visam à qualidade sanitária nesse local são caracterizados por autoclavagem de ração e maravalha, utilização de roupa e luvas no cuidado com os animais, exames sorológicos dos animais, climatização, exaustão e desinfecção química com solução de hipoclorito de sódio a 2% semanalmente e desinfecção semestral por combustão de formaldeído.

Os espécimes animais são oriundos de matrizes livres de patógenos específicos, inclusive zoonoses, de ratos Wistar heterogênicos e camundongos Swiss heterogênicos, doadas à FURG pelo CEMIB-Unicamp.

Também a qualificação dos profissionais é fator preponderante nesta instituição, por meio do treinamento e atualização dos mesmos seguindo os padrões de biossegurança e ética para a utilização com animais. Assim, o Biotério Central da FURG é referência para a região, fornecendo animais para diversas universidades do estado, além dos departamentos da própria Instituição.

Percebendo-se a importância do conhecimento da microbiota anemófila no ar do ambiente interno do Biotério desta Universidade e do impacto que essa microbiota pode gerar junto aos trabalhadores, além da exposição dos animais nele acondicionados, este trabalho teve como objetivo conhecer a presença de fungos no ar dessas instalações, avaliando a contaminação fúngica antes e após o procedimento de limpeza semestral de rotina.

MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo, foram coletadas amostras de ar em três salas do Biotério Central da FURG, denominadas Módulo Camundongos, Módulo Ratos I e Módulo Ratos II, antes e após o procedimento de desinfecção desses locais com vapor de formaldeído. Nesses ambientes, os animais são acondicionados em gaiolas de material acrílico com tampa de grade em aço inoxidável, sustentadas em estantes de aço galvanizado, onde recebem alimentação e água *ad libitum* além de cuidados diários. O fundo das gaiolas é preenchido com maravalha comercial autoclavada. Os cuidados são realizados pela equipe de servidores composta por médico veterinário (um), biólogo (um), técnico de laboratório (um), auxiliares de veterinária (três) e

servente de limpeza terceirizada (uma). As salas possuem climatização com controle dos níveis de umidade e de temperatura diários.

As coletas foram realizadas por meio da técnica de sedimentação em placa de Petri contendo meio de cultura PDA (Accumedia®) estéril em triplicata, por um período de 10 minutos e a 1 metro de altura do piso. Após esse período, as placas foram fechadas, identificadas com o número da amostra, datadas e encaminhadas ao Laboratório de Micologia do Setor de Parasitologia e Micologia do Departamento de Patologia desta Universidade, onde foram devidamente incubadas em estufa microbiológica Biomatic® a 25 °C por cinco dias para o crescimento fúngico. Transcorrido esse prazo, foram analisadas as colônias encontradas e quantificadas as unidades formadoras de colônias (UFCs) por placa. A identificação dos gêneros encontrados foi realizada por meio da observação macroscópica das colônias, associando-se ao exame direto em lâmina com lactofenol azul de algodão em microscópio óptico CX41 Olympus® para a visualização de características microscópicas.

A identificação dos gêneros fúngicos baseou-se nos trabalhos de Alexopoulos et al. (1996); Barnett e Hunter (1998); Lacaz (2002), e Putzke e Putzke (2004)¹³⁻¹⁶. Os gêneros isolados e identificados foram inoculados em tubo de ensaio contendo SDA (Accumedia®) inclinado e tamponado com algodão hidrófilo, para obtenção de colônias puras, e incubados em estufa microbiológica por 5-7 dias a 25 °C.

Os gêneros fúngicos encontrados foram quantificados com base na frequência em que ocorrem nas amostras, seguindo-se o critério de Yadav e Medelin, proposto por Esquivel et al. (2004)⁸. A presença fúngica foi mensurada em UFCs e calculadas as frequências em tabelas de contingência.

Os gêneros identificados neste trabalho foram incorporados à Coleção de Fungos do Laboratório de Micologia desta Universidade.

RESULTADOS

Após o procedimento de cultivo e identificação dos gêneros fúngicos encontrados nas duas coletas, observou-se que houve predominância dos gêneros *Penicillium* (32,47%), *Cladosporium* (22,08%) e de fungos não-esporulados (25,97%) obtidos na 1.^a coleta realizada antes do procedimento de desinfecção por vapor de formaldeído (Tabela 1).

TABELA 1 – Resultados totais obtidos na 1.ª coleta no Biotério – FURG

Gênero fúngico encontrado	UFCs	%	Ocorrência fúngica (Esquivel, 2004)
<i>Penicillium</i>	25	32,47	Ocasional
Não-esporulados	20	25,97	Ocasional
<i>Cladosporium</i>	17	22,08	Ocasional
<i>Acremonium</i>	9	11,69	Raro
<i>Helminthosporium</i>	4	5,19	Raro
<i>Aspergillus</i>	1	1,3	Raro
<i>Rhizopus</i>	1	1,3	Raro
Total	77	100	

No que diz respeito aos módulos Camundongos e Ratos I e II, observou-se no primeiro maior predominância de fungos do gênero *Penicillium* (29,41%). No módulo Ratos I, predominaram *Penicillium* (35,72%) e fungos não-esporulados (35,72%). No módulo Ratos II, a predominância esteve nos gêneros *Cladosporium* (34,38%) e *Penicillium* (31,25%) (Tabela 2).

TABELA 2 – Freqüência da diversidade fúngica por sala na 1ª. coleta – Biotério – FURG

Gênero fúngico	Mód. Comundongos		Mód. Ratos I		Mód. Ratos II	
	UFCs	%	UFCs	%	UFCs	%
<i>Penicillium</i>	5	29,41	10	35,72	10	31,25
<i>Cladosporium</i>	4	23,53	2	7,14	11	34,38
<i>Acremonium</i>	3	17,65	4	14,28	2	6,25
<i>Helminthosporium</i>	0	0	1	3,57	3	9,37
<i>Aspergillus</i>	1	5,88	0	0	0	0
<i>Rhizopus</i>	0	0	1	3,57	0	0
Não-esporulados	4	23,53	10	35,72	6	18,75
TOTAL	17	100	28	100	32	100

Após a desinfecção com vapor de formaldeído, observou-se maior prevalência de fungos não-esporulados (50,0%) e *Cladosporium* (37,5%), embora o número total de UFCs tenha sido reduzido (Tabela 3).

TABELA 3 – Resultados totais obtidos na 2ª. coleta no Biotério – FURG

Gênero fúngico encontrado	UFCs	%	Ocorrência fúngica (Esquivel, 2004)
Não-esporulados	16	50,0	Freqüente
<i>Cladosporium</i>	12	37,5	Ocasional
<i>Penicillium</i>	2	6,25	Raro
<i>Aspergillus</i>	1	3,125	Raro
<i>Rhizopus</i>	1	3,125	Raro
TOTAL	32	100	

No que diz respeito aos módulos Camundongos e Ratos I e II, após a desinfecção por vapor de formaldeído, observou-se nos módulos Camundongos e Ratos I prevalências maiores de fungos não-esporulados

(62,5% e 53,9%, respectivamente). No entanto, no módulo Ratos II houve maior predominância do gênero *Cladosporium* (63,6%) (Tabela 4).

TABELA 4 – Frequência da diversidade fúngica por sala na 2.^a coleta – Biotério – FURG

Gênero fúngico	Mód. Camundongos		Mód. Ratos I		Mód. Ratos II	
	UFCs	%	UFCs	%	UFCs	%
<i>Penicillium</i>	1	12,5	1	7,7	0	0
<i>Cladosporium</i>	2	25	3	23	7	63,6
<i>Aspergillus</i>	0	0	1	7,7	0	0
<i>Rhizopus</i>	0	0	1	7,7	0	0
Não-esporulados	5	62,5	7	53,9	4	36,4
TOTAL	8	100	13	100	11	100

Neste estudo, observou-se que o processo de desinfecção por vapor de formaldeído foi substancialmente eficaz no que diz respeito à diminuição da população fúngica nos locais estudados, pois promoveu uma redução na ordem de 58,4% em UFCs.

DISCUSSÃO

No que diz respeito à diversidade fúngica anemófila encontrada, este estudo confirma estudos realizados em ambientes internos. Molinaa et al. (2002), pesquisando o ar de ambientes interiores de um hospital, encontraram como mais freqüente *Cladosporium*, seguido de outros fungos, entre eles *Penicillium*, presentes neste trabalho antes e depois do processo de desinfecção⁵.

Essa diversidade de fungos em ambientes fechados, segundo Gontijo Filho et al. (2000), resulta da disseminação ocasionada pelo regime de ventos, entre outros fatores abióticos do ambiente externo, e correlaciona-se principalmente no aparecimento de gêneros característicos da micobiota local de determinada região¹⁷.

Em pesquisas em ambientes abertos, os gêneros *Penicillium*, *Cladosporium* e fungos não-esporulados são também citados como mais freqüentes, confirmando essa relação entre ambientes abertos e fechados, assim como neste estudo^{4,5,7-9,17}. Esses gêneros são considerados como contaminantes ambientais, sendo encontrados em diversos ambientes. Sua relação com a saúde humana e até mesmo animal somente está relacionada com quadros de patologias oportunistas quando do desenvolvimento de severa imunossupressão^{11,13-16}.

CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente estudo evidenciou não somente a presença de fungos anemófilos no Biotério Central desta Universidade,

mas também a eficácia do procedimento de desinfecção adotado por esta Instituição na redução e eliminação de contaminantes ambientais nesse tipo de local. Também é evidente que o vapor de formaldeído mostrou-se eficaz na redução da diversidade fúngica, promovendo uma redução de cerca de 58,4% em UFCs. Embora o número de amostras tenha sido reduzido e a técnica utilizada não tenha sido eficiente para a identificação de fungos que não apresentam esporulação, a originalidade deste trabalho não deve ser depreciada, conduzindo, futuramente, para estudos mais aprofundados de controle ambiental em biotérios.

REFERÊNCIAS

1. CARDOSO, T. A. O. Considerações sobre a biossegurança em arquitetura de biotérios. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 64-67: 3-17, 2001.
2. MERUSSE, J. L. B.; LAPICHICK, V. B. V. Instalações e equipamentos. In: *Manual para técnicos em bioterismo*. Brasília: COBEA; 1996.
3. FRANÇA, M. B. P. *Programação arquitetônica de biotérios*. Brasília: Ministério da Educação, 1986.
4. CHAO, H. J.; SCWARTZ, J.; MILTON, D. K.; BURGE, H. A. Populations and determinants of airborne fungi in large office buildings. *Environ. Health Perspect.* 110: 777-82, 2002.
5. MOLINAA, R. T.; GARIJOB, M. A. G.; RODRIGUEZ, A. F. M.; PALACIOS, I. S. Pollen and spores in the air of a hospital out-patient ward. *Allergol. Immunopathol.* 30: 232-8, 2002.
6. STRAUSS, M. C. *Análise de um acidente fúngico na Biblioteca Central de Manguinhos: um caso de Síndrome do Edifício Doente*. Rio de Janeiro, 2001. Dissertação [Mestrado] – Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, 2001.
7. MEZZARI, A.; PERIN, C.; SANTOS JÚNIOR, S. A.; BERND, L. A. G. Airborne fungi in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 44(5): 269-72, 2002.
8. ESQUIVEL, P.; MANGIATERRA, M.; GIUSIANO, G.; SOSA, M. A. Microhongos anemófilos en ambientes abiertos de dos ciudades del nordeste argentino. *Boletín del Instituto de Medicina Regional*, Universidad Nacional del Nordeste, Resistencia, Argentina, 2004.
9. MENEZES, E. A.; TRINDADE, E. C. P.; COSTA, M. M.; FREIRE, C. C. F.; CAVALCANTE, M. S.; CUNHA, F. A. Airborne fungi isolated from Fortaleza city, state of Ceara, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 46(3):133-37, 2004.
10. PECHER, S. A.; CASTRO, G. B.; BORRÁS, M. R. L. Inquérito sobre fungos anemófilos na fronteira Brasil-Colômbia. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 21(2): 63-6, 1988.
11. TRABULSI, L. R.; ALTHERTUN, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. *Microbiologia*. 3. ed. S. Paulo: Atheneu; 1999.
12. SEAMER, J. H.; WOOD, M. *Handbooks 5: safety in the animal house*. London: Laboratory Animals Ltd.; 1981.

13. ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. *Introductory mycology*. 3. ed. John Wiley & Sons; 1996.
14. BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4. ed. APSA; 1998.
15. LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. *Tratado de micologia médica*. 9. ed. Sarvier, 2002.
16. PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. *Os reinos dos fungos*. 2. ed. Santa Cruz do Sul: Edunisc, 2004.
17. GONTIJO FILHO, P. P.; SILVA, C. R. M.; KRITSKI, A. L. Ambientes climatizados, Portaria 3.523 de 28.08.98 do Ministério da Saúde e padrões de qualidade do ar de interiores do Brasil. *J. Pneumologia*, 26(5), 2000.

Recebido: 20/2/07
Aceito: 10/3/07