

Programa nacional de avaliação externa da qualidade de microbiologia do ar (2010-2022)

Portuguese external quality assessment programme of air microbiology (2010-2022)

Manuela Cano¹, Ana Paula Faria², Helena Correia², Cristina Almeida¹, Nuno Rosa¹, Cláudia Júlio¹

manuela.cano@insa.min-saude.pt

(1) Unidade do Ar e Saúde Ocupacional, Departamento de Saúde Ambiental, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Unidade de Avaliação Externa da Qualidade, Departamento de Epidemiologia, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

A Unidade de Ar e Saúde Ocupacional (UASO) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge implementou os procedimentos necessários para a acreditação dos ensaios de amostragem e determinação analítica de microrganismos cultiváveis em suspensão no ar, de acordo com o referencial da norma NP EN ISO/IEC 17025 que estabelece os requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração. Face à inexistência de programas de avaliação externa da qualidade (AEQ), a Unidade de Ar e Saúde Ocupacional organizou, em colaboração com o Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ), os programas de AEQ – Microbiologia do Ar e de Identificação de Fungos em Cultura.

O Programa de Microbiologia do Ar consiste na avaliação do processo de amostragem de ar e posterior análise laboratorial, tendo como objetivo a quantificação de bactérias e fungos em suspensão no ar, sendo complementado com o programa de AEQ de Identificação de Fungos em Cultura, que avalia a competência laboratorial para identificação de fungos.

O tratamento dos resultados de AEQ do Programa de Microbiologia do Ar inclui o cálculo do índice de desvio (avaliação do desempenho) e do coeficiente de variação. No programa de AEQ de identificação de fungos em cultura os resultados são classificados de acordo com a identificação à espécie/género, através da atribuição de scores.

O presente trabalho pretende realizar uma avaliação crítica dos resultados, obtidos ao longo de 12 anos de atividade do Programa de Avaliação Externa da Qualidade de Microbiologia do Ar e do Programa de Identificação de Fungos em Cultura, salientando a sua importância para a avaliação da qualidade do ar.

_Abstract

The Air and Occupational Health Unit (UASO) from the National Institute of Health Doctor Ricardo Jorge has implemented the necessary procedures to accredit the sampling and analytical determination of airborne cultivable microorganisms in accordance with the NP EN ISO/IEC 17025 standard, an indicator of technical competence and quality assurance. Given the lack of proficiency testing schemes, the Air and Occupational Health Unit organized, in collaboration with the Portuguese External Quality Assessment Programme (PNAEQ), the External Quality Assessment - Air Microbiology and Identification of Fungi in Culture programmes. The Air Microbiology Program consists of evaluating the air sampling process and subsequent laboratory analysis, with the aim of quantifying bacteria and fungi suspended in the air, and the Fungus Identification Program, which in addition, evaluates laboratory competence in identifying fungi in culture.

The Air Microbiology Program's results processing, includes the calculation of the Z-score and the coefficient of variation, making it possible to classify the results into categories. Results classification in fungi identification program are according to the species/genus identification, by assigning scores. The aim of this work is to carry out, a critical evaluation of the results obtained over 12 years of the External Quality Assessment Programme for Air Microbiology and Fungi Identification, highlighting its importance in air quality evaluation.

_Introdução

A avaliação do risco de exposição profissional a agentes biológicos pode basear-se na determinação da concentração de bactérias e fungos cultiváveis em suspensão no ar dos locais de trabalho, onde é exetável a sua libertação durante a realização das diversas atividades pelos trabalhadores. O Decreto-Lei n.º 84/97, de 16 de abril, estabelece as regras de proteção dos trabalhadores contra riscos de exposição a agentes biológicos. A presença de agentes biológicos com efeitos nocivos para a saúde humana pode dever-se a diversos processos, designadamente em resultado do desenvolvimento das biotecnologias, através das quais se procede à sua produção e utilização, ou na sequência da sua libertação sem que os mesmos sejam o objeto de trabalho. Os trabalhadores podem estar potencialmente expostos a agentes biológicos com risco para a saúde em diversas atividades, nomeadamente: agricultura; pecuária; recolha e tratamento de resíduos; tratamento de águas residuais, diversos ramos da indústria, entre outros.

Por outro lado, a legislação nacional relativa à qualidade do ar interior (QAI), o Decreto-Lei n.º 101-D/2020, de 7 de dezembro, e a Portaria n.º 138-G/2021, de 1 de julho, estabelecem, entre outros, concentrações máximas de referência para poluentes microbiológicos (bactérias e fungos), sendo necessária a determinação da sua concentração no ar.

Como consequência da aplicação da legislação verificou-se o aumento significativo do número de avaliações da QAI e de avaliações de risco de exposição profissional, sendo imperativo harmonizar os procedimentos de amostragem e de análise, tendo como objetivo obter resultados comparáveis, entre os diversos prestadores de serviços nesta área.

Face à inexistência de programas de AEQ, a UASO, em colaboração com o PNAEQ, organizou em 2010 o programa-piloto de AEQ em Microbiologia do Ar - contagem de bactérias e fungos, e em 2012 o programa de Microbiologia do Ar - identificação de fungos em cultura, que se mantém atualmente.

_Objetivo

Apreciar os resultados obtidos ao longo dos 12 anos (2010 e 2022) do Programa de Avaliação Externa da Qualidade de Microbiologia do Ar, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

_Material e métodos

Os Programas de Avaliação Externa da Qualidade – Microbiologia do Ar e Identificação de Fungos em cultura - avaliam a amostragem de ar e a análise laboratorial, no que respeita à quantificação de bactérias e de fungos em suspensão no ar e à identificação de espécies de fungos filamentosos em cultura. Os laboratórios participantes são, na sua maioria, nacionais, contudo, a partir de 2019 os Programas passaram a contar com laboratórios estrangeiros, dois de países europeus e um de país africano.

O PNAEQ elabora as cartas de instruções e respetivos formulários de resposta, disponibilizando aos participantes as informações necessárias para a realização de cada ensaio.

No Programa de Microbiologia do Ar são realizados dois ensaios por ano, de modo a contemplar as variações sazonais, expectáveis para a contaminação microbiológica do ar (estação quente e estação fria). São efetuadas colheitas em vários locais com diferentes graus de contaminação microbiológica e com ocupação variável, tais como: sala limpa, laboratório, biblioteca, refeitório, sala de reuniões/formação, anfiteatro e exterior.

A colheita é realizada em simultâneo por todos os participantes, com recurso aos amostradores e meios de cultura utilizados em rotina nos respetivos laboratórios, em dois pontos de amostragem (PC1 e PC2), preferencialmente, com diferentes graus de contaminação. As placas são posteriormente incubadas, sendo calculada a concentração de microrganismos com base na contagem obtida e no volume de ar colhido por cada laboratório.

A análise, tratamento e apreciação dos resultados (Exce-lente; Bom; Satisfatório; Insatisfatório) são realizados pelo PNAEQ, nomeadamente os cálculos da média de consenso, do desvio padrão, do coeficiente de variação, do viés e do índice de desvio, com base no referencial normativo, norma NP EN ISO/IEC 17043 (1).

Para a identificação de fungos em cultura são enviadas, uma vez por ano, duas estirpes para identificação (ao género ou à espécie). A identificação dos fungos filamentosos em cultura é classificada com scores: 0 - identificação incorreta; 1 - identificação correta ao género; 2 - identificação correta ao género e/ou espécie conforme o requerido pelo PNAEQ.

No final de cada ano, o organizador do programa, apresenta aos Laboratórios participantes os resultados do ano anterior tratados e promove a formação dos participantes nas áreas que identifica como mais sensíveis.

_Resultados e discussão

Ao longo do período de 12 anos em que decorreu o Programa Microbiologia do Ar, no qual o número de participantes foi variável, utilizaram-se 14 equipamentos diferentes, embora com o mesmo princípio de funcionamento, o impacto do ar em meio de cultura semissólido, após passar por um crivo. Os caudais de amostragem variaram entre 90 e 360 L/min.

As concentrações de microrganismos no ar são expressas em UFC/m³ e calculam-se tomando por base a contagem em cada placa (nº de unidades formadoras de colónias-UFC) e o volume de ar colhido.

artigos breves_ n. 14

Nos gráficos seguintes apresentam-se os resultados obtidos para as concentrações de bactérias (**gráfico 1**) e fungos (**gráfico 2**) para a estação fria (outono/inverno), nos dois pontos de colheita (PC1 e PC2), para o período em estudo (2010 a 2022).

Gráfico 1: ▾ Concentração de bactérias no ar (UFC/m³) para os dois ensaios que decorreram durante a estação fria (outono/inverno), de 2010 a 2022.

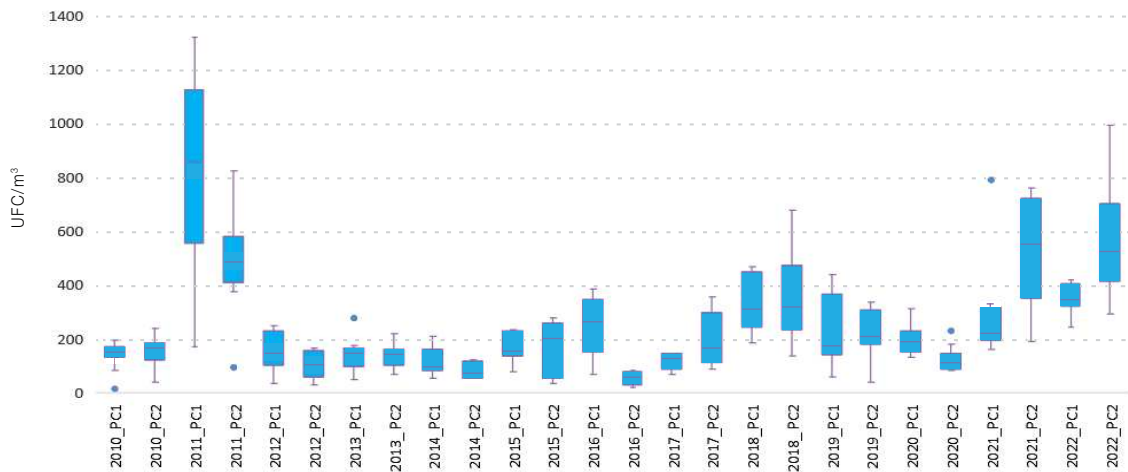
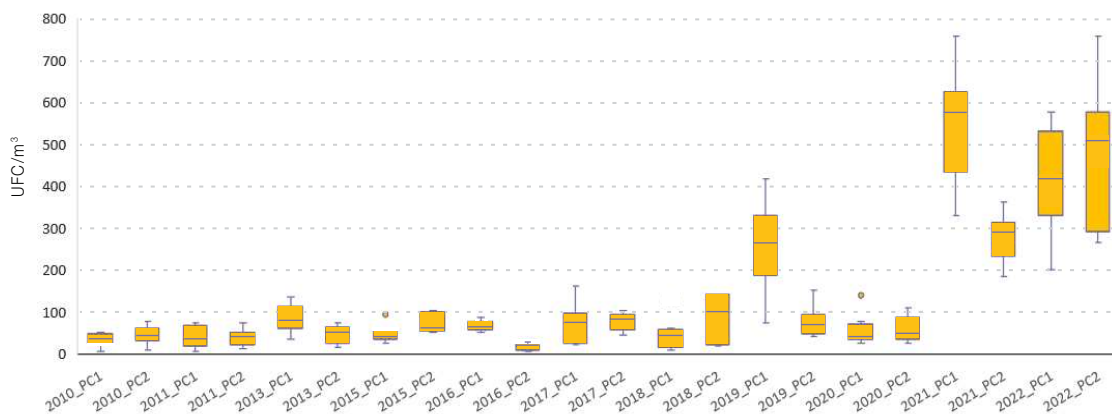


Gráfico 2: ▾ Concentração de fungos no ar (UFC/m³) para os 2 ensaios que decorreram durante a estação fria (outono/inverno), de 2010 a 2022.



artigos breves_ n. 14

A análise dos resultados obtidos pelos participantes, para a estação fria, durante o período de estudo (2010-2022), revelou que as concentrações de bactérias variaram entre 14-1316 UFC/m³, com uma mediana de 190 UFC/m³ e as concentrações de fungos variaram entre 4-924 UFC/m³, com uma mediana de 65 UFC/m³.

Verifica-se uma grande homogeneidade nos resultados das concentrações de bactérias, para concentrações inferiores a 200 UFC/m³. Para valores de concentração superiores verifica-se um aumento na dispersão dos resultados dos participantes, como pode ser verificado pela análise dos resultados

obtidos para os ensaios PC1(2011), PC2 (2021) e PC2 (2022), cujas medianas das contagens de bactérias ficaram acima de 800 UFC/m³ (2011) e das 500 UFC/m³ (2021 e 2022).

Para os fungos verificou-se maior dispersão de resultados nos ensaios PC1 em 2021 e PC1 e PC2 em 2022 com concentrações acima de 400 UFC/m³.

Nos gráficos seguintes são apresentadas as concentrações de bactérias (**gráfico 3**) e de fungos (**gráfico 4**) para a estação quente (primavera/verão) ao longo do período de estudo 2010-2022.

Gráfico 3: ▾ Concentração de bactérias no ar (UFC/m³) durante a estação quente (primavera/verão) de 2010 a 2022.

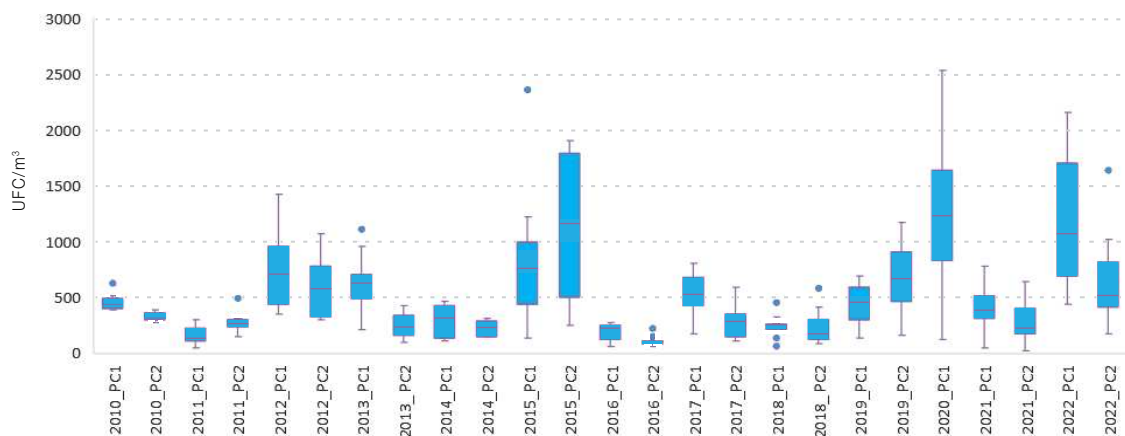
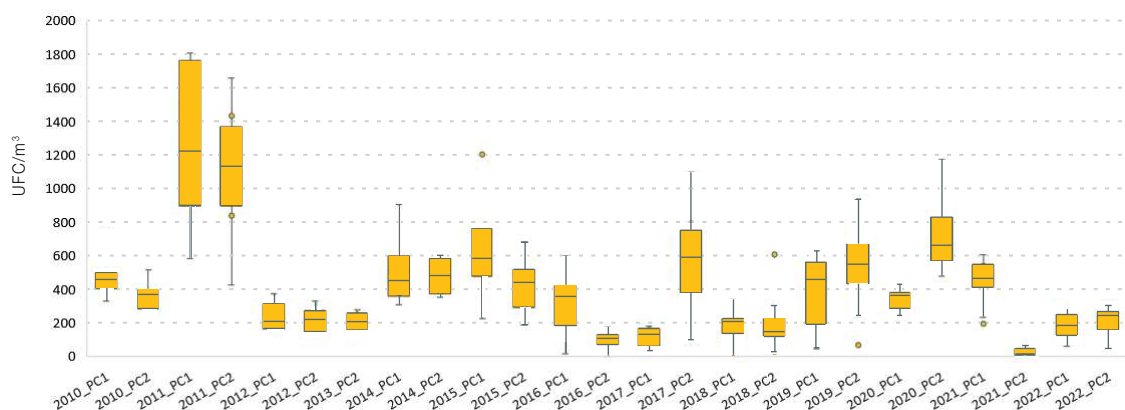


Gráfico 4: ▾ Concentração de fungos no ar (UFC/m³) durante a estação quente (primavera/verão) de 2010 a 2022.



artigos breves_ n. 14

A análise dos resultados obtidos na estação quente (2010-2022) revelou concentrações de bactérias entre 20-2538 UFC/m³, com uma mediana de 373 UFC/m³ e concentrações de fungos variaram entre 0-3496 UFC/m³, com uma mediana de 310 UFC/m³.

Nesta estação, as concentrações de microrganismos cultiváveis são, de um modo geral, mais elevadas.

Por outro lado, verificou-se que os menores coeficientes de variação, de 9,6% no caso das bactérias e de 13,4% para fungos, foram obtidos para concentrações de cerca de 400 UFC/m³ que corresponde a contagens da ordem das 100 UFC/placa, referidas na norma como aquelas em que o erro nas contagens é menor. Estes resultados vão de encontro à recomendação da Norma EN 13098 (2) de ajustar o volume de ar colhido em placas de 90 mm de modo a obter cerca de 100 UFC/placa.

Não foram incluídos neste estudo os resultados das colheitas de fungos relativos aos ensaios de 2012 (ensaio 2), de 2013 (PC1) e 2014 (ensaio 2), devido à contaminação das placas pela espécie *Chrysonilia sitophila* ou obtenção de contagens acima ou abaixo do limite de quantificação.

A análise dos resultados obtidos para a determinação de bactérias no ar, no período em estudo, demonstrou que a percentagem de participantes com desempenho de excelente, bom ou satisfatório foi de 92%, para ambas as estações (quente e fria).

Por outro lado, para determinação de fungos no ar, o desempenho foi excelente, bom ou satisfatório em 92% e 96% dos participantes, para as estações quente e fria, respetivamente.

Os resultados revelam que foi na estação quente que se obtiveram as concentrações mais elevadas tanto para as bactérias como para os fungos, resultados concordantes com outros estudos que sugerem que há variações sazonais na concentração de microrganismos em suspensão no ar e que justificam a existência duas rondas (estação quente e estação fria). Segundo Kumar *et al*, 2021 (3) a concentração

de bactérias e fungos no ar interior foi significativamente maior no verão e no outono comparativamente com outras estações.

A abundância e diversidade dos bioaerossóis também são influenciadas por outros fatores, como ventilação e a atividade humana. Por outro lado, o estudo sistemático de revisão sobre a concentração de esporos de fungos no exterior em países europeus, confirmou que o verão e o outono são reconhecidos como as estações com maior concentração de esporos de fungos (4).

Os gráficos 5 e 6 apresentam os resultados dos ensaios do Programa de Identificação de Fungos em Cultura, ao género e à espécie, respetivamente.

Gráfico 5: Resultados da identificação de fungos ao género (%), entre 2012 e 2022.

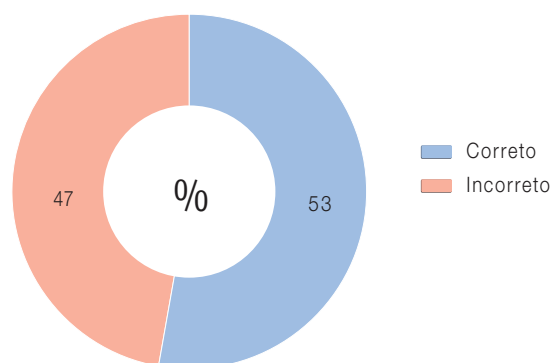
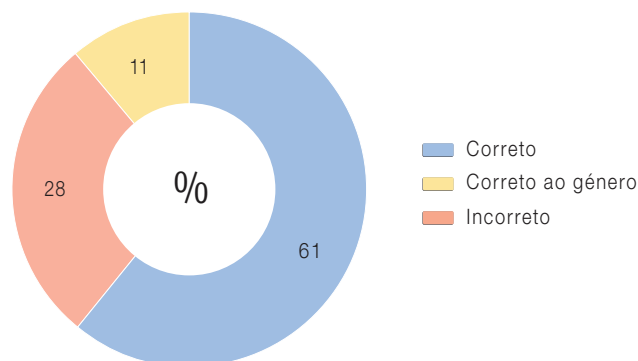


Gráfico 6: Resultados da identificação de fungos à espécie (%), entre 2012 e 2022.



Foram enviadas um total 20 culturas de fungos comuns no ambiente interior/exterior, para identificação ao género ou à espécie, conforme solicitação do programa (2012 a 2022). Identificação para as seguintes espécies: *Epicoccum nigrum*; *Scopulariopsis candida*; *Emericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*); *Syncephalastrum racemosus*; *Penicillium chrisogenum*; *Verticillium tenerum*; *Beauveria bassiana*; *Trichosporom asahii*; *Mucor racemosus*; *Trichotecium roseum*; *Tritirachium ortzae*; *Sporothrix schenki*; *Acremonium strictum*; *Paecilomyces lilacinus*; *Bipolaris rostrata* e para os seguintes géneros: *Eurotium chevalieri*; *Ulocladium botrytis*; *Trichoderma viride*; *Phoma herbarum*.

Quando solicitada a identificação de fungos ao género, verifica-se que a percentagem de resultados corretos foi de 53% (9/17). Quando a identificação foi solicitada à espécie, 61% (22/36) identificaram corretamente, 11% (4/36) apenas identificaram o género e em 28% (10/36) o resultado foi incorreto.

Ao longo dos 12 anos do programa foram identificadas diversas necessidades de formação por parte dos participantes, tendo sido organizadas sessões de formação subordinadas aos temas: Estimativa de Incertezas em Ensaios Microbiológicos (2011); Garantia da Qualidade dos Resultados (2013); Otimização das Condições de Ensaio (2014).

Conclusão

A análise dos resultados obtidos no período em estudo, demonstrou que a percentagem de participantes com um desempenho de excelente, bom ou satisfatório foi superior a 90% para qualquer dos microrganismos.

O programa Microbiologia do Ar tem permitido, além de comparação os resultados dos seus participantes, uma harmonização de procedimentos, melhorando o controlo de qualidade, a rastreabilidade das medições, facilitando a validação de resultados e todo o processo conducente à acreditação dos ensaios.

Os temas mais debatidos nas ações de formação relativas à Microbiologia do Ar têm sido a calibração de equipamentos, a estimativa de incertezas, os critérios de aceitação de duplicados de colheitas e o controlo das condições dos ensaios de amostragem e laboratoriais.

A identificação correta de fungos em cultura baseia-se em grande medida, no treino dos Técnicos pelo que é muito importante manter este tipo de ensaios para que os Laboratórios tenham oportunidade de proceder à identificação de espécies de fungos, que embora comuns no ambiente, nem sempre se encontram nas amostras naturais.

A participação em programas de avaliação externa da qualidade permite, além do contacto privilegiado com outros profissionais da mesma área de trabalho e do acesso a ações de formação de acordo com as necessidades, a avaliação do desempenho e a implementação de ações corretivas se aplicável.

Referências bibliográficas:

- (1) ISO/IEC 17043:2023. Conformity assessment – General requirements for the competence of proficiency testing providers.
- (2) Norma EN 13098: 2019. Workplace exposure – Measurement of airborne microorganisms and microbial compounds – General requirements.
- (3) Kumar P, Singh AB, Singh R. Seasonal variation and size distribution in the airborne indoor microbial concentration of residential houses in Delhi and its impact on health. *Aerobiologia* (Bologna). 2021;37(4):719-732. <https://doi.org/10.1007/s10453-021-09718-3>
- (4) Anees-Hill S, Douglas P, Pashley CH, et al. A systematic review of outdoor airborne fungal spore seasonality across Europe and the implications for health. *Sci Total Environ*. 2022 Apr 20;818:151716. Epub 2021 Nov 17. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151716>