

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

*Estudo da prevalência de fungos em
travesseiros de crianças com rinite
e, ou, asma.*

SANDRA REGINA LEITE ROSA OLBRICH

Botucatu- 2010



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



*Estudo da prevalência de fungos em
travesseiros de crianças com rinite
e, ou, asma.*

Sandra Regina Leite Rosa Olbrich

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Bagagli

*Tese apresentada ao Instituto de
Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção de título
de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e
aplicada.*

Botucatu- 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Obrich, Sandra Regina Leite Rosa.

Estudo da prevalência de fungos em travesseiros de crianças com rinite e, ou, asma / Sandra Regina Leite Rosa Olbrich. – Botucatu, 2010.

Tese (doutorado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010.

Orientador: Eduardo Bagagli

Capes: 20100000

1. Alergia em crianças. 2. Asma em crianças. 3. Rinite. 4. Fungos.

Palavras-chave: Alergia; Asma; Fungo; Rinite; Travesseiro.

Jaime

*....” e desde então sou porque tu és, e desde então és,
sou e somos e por amor serei, serás, seremos “*

e assim começou a nossa história...

*..dois amantes felizes não têm fim nem morte, nascem
e morrem muitas vezes enquanto vivem, têm da
natureza a eternidade.*

Pablo Neruda

Amor eterno, amor verdadeiro, amor companheiro.

A você, mãe querida, meu amor eterno e minha gratidão. Ao meu pai, que com certeza deve estar muito orgulhoso.

A minha família, em especial a Natália, minha sobrinha e seguidora, que vibram com as minhas conquistas dando força para alcançar os meus objetivos.

Ao Professor Dr. Eduardo

O meu mais sincero e profundo agradecimento pelos ensinamentos, amizade, acolhimento, dedicação, seriedade e grande incentivo em mais esta fase da minha vida profissional e acadêmica. Pode ter certeza que jamais esquecerei a amizade e sabedoria a mim transmitidas.

Agradecimentos

Há algumas oportunidades na vida científica para aprendermos que a execução de ideias depende do trabalho em equipe, muito obrigada a todos:

A todos os pacientes participantes deste projeto, vocês foram a base de todo este trabalho.

Severino Assis Macoris, obrigada pelos ensinamentos, pela amizade, paciência, tolerância, pela colaboração permanente e pela receptividade.

Ariane C M O Bruder Nascimento pelo auxílio extremamente valiosa na identificação das leveduras.

Ao Prof. Dr. Jaime pelas sugestões, pela ajuda fundamental nas questões alérgicas, imunológicas e outras coisas mais e, pela paciência nos últimos meses de preparação desta tese.

Ao Prof. Dr. Zuliani por possibilitar e facilitar o acesso ao Ambulatório de Alergia.

Ao Prof Dr. Montelli que prontamente emprestou o equipamento para aspiração dos fungos.

A Profa Dra. Líciana Vaz de Arruda Silveira do Instituto de Biociências, Departamento de Bioestatística, pela valorosa análise estatística.

Aos funcionários do Departamento de Enfermagem, Fernando e Aguinaldo, sempre prontos.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, em especial ao Sr. Edemival, pela sua prontidão.

A Meire, bibliotecária, pelo correção das referências.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação do Instituto de Biociência - UNESP em especial a Luciene, pelo auxílio sempre que necessário.

Ao Grupo de Apoio à pesquisa da Faculdade de Medicina pelo auxílio.

.....Há oportunidades em que além do trabalho em equipe, existem alguns privilegiados casos, onde acontece a amizade:

Virgínia, Raquel, Sandra, Ariane, Tâmara, Assis, Carlos pelos ensinamentos, por terem me acolhido de forma tão carinhosa.

A minha amiga Zeca, pela amizade e por estar ao meu lado nos momentos de muitas conquistas, várias vitórias e algumas derrotas .

SUMÁRIO

<i>Resumo</i>	11
<i>Abstract</i>	13
<i>1.0 - Introdução</i>	15
<i>2.0 - Objetivo</i>	27
<i>2.1 – Objetivos específicos</i>	27
<i>3.0 – Sujeitos e métodos</i>	28
<i>3.1 - Sujeitos</i>	28
<i>3.2 - Métodos</i>	29
<i>3.2.1 - Coleta dos travesseiros dos pacientes</i>	29
<i>3.2.2 - Travesseiros controle</i>	30
<i>3.2.3 - Cultivo, contagem das colônias e identificação dos fungos</i>	31
<i>3.2.4 - Extração do DNA genômico</i>	33
<i>3.2.5 - Tratamento das amostras de RNase</i>	33
<i>3.2.6 - Análise do produto em gel agarose</i>	33
<i>3.2.7 - Reação de PCR</i>	34
<i>3.2.8 - Sequência do DNA</i>	34
<i>3.2.9 - Análise das sequências completas</i>	35
<i>3.3 - Aspectos éticos</i>	35
<i>3.4 - Análise estatística</i>	35
<i>4.0 - Resultados</i>	36
<i>4.1 - Aspectos epidemiológicos</i>	36
<i>4.2 - Aspectos relativos aos travesseiros</i>	39
<i>4.3 - Análise das extrações de DNA e sequenciamento gênico</i>	57
<i>5.0 - Discussão</i>	62
<i>6.0 - Conclusões</i>	73
<i>Referências bibliográficas</i>	75
<i>Anexos</i>	87
<i>1 . Ficha de avaliação dos pacientes, domicílio e travesseiros</i>	87
<i>2 . Termo de consentimento pós informado</i>	89
<i>3 . Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa</i>	90
<i>4 . Manuscript to be submitted : Pediatric Allergy and Immunology</i>	91

RESUMO

Estudo da prevalência de fungos em travesseiros de crianças com rinite e, ou, asma.

Introdução: O crescente interesse por micro-organismos alergênicos, a procura por novos reservatórios, além do interesse em fungos anemófilos, a grande frequência e diversidade, bem como a associação com doenças alérgicas, motivaram o estudo. A identificação e quantificação dos fungos em travesseiros poderão proporcionar avanços no diagnóstico e nas medidas ambientais. **Objetivos:** Avaliar ocorrência de fungos em travesseiros de crianças alérgicas, o ambiente e os aspectos envolvidos. **Métodos.** Pacientes do Ambulatório de Imunologia e Alergia do Hospital das Clínicas de Botucatu preencheram questionário com dados epidemiológicos e clínicos e os travesseiros utilizados pelas crianças foram coletados, na residência, colocados em saco plástico estéril. Para o controle, foram adquiridos três travesseiros novos. Todos foram trazidos ao laboratório de Micologia do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP e foram aspirados, dentro da câmara de fluxo, com amostrador de ar MAS-100NT[®] por cinco minutos em cada área- externa e interna. Utilizadas três placas para cada aspirado com três diferentes meios de cultura. As identificações foram feitas pelos métodos micológicos tradicionais e, para alguns, foram realizadas extrações de DNA e sequenciamento. **Resultados:** Todos procedentes de diferentes regiões de Botucatu, 4,46% dos pacientes do Ambulatório de Alergia e Imunologia, que realizaram teste de sensibilização, eram positivo para os fungos testados; a maioria dos pacientes era sensibilizada a mais de um alérgeno, os mais frequentes foram: *Dermatophagoides Farinae*, *Dermatophagoides Pteronyssinus*, *Blomia tropicalis* e fungos; 80% dos pacientes tinham rinite e 50% também tinham asma; nenhum ambiente, avaliado no domicílio dos pacientes, revelou-se adequado para pacientes alérgicos; somente dois travesseiros tinham capa adequada e se encontravam visivelmente limpos; todos os travesseiros dos pacientes estavam contaminados com fungos e, em alguns deles, também se encontrou presença de bactérias tanto na área externa como na interna; todos os travesseiros controle estavam contaminados com fungos, segundo o fabricante todos eram antialérgicos, antiácaros e antimofos; a média de UFC/m² foi estatisticamente superior nos travesseiros com tempo de uso maior que a sete anos; o meio de cultura melhor avaliado foi o SDA, revelando-se superiores aos demais meios utilizados, porém, se tivéssemos utilizado um único meio, muito micro-organismos não teriam sido

identificados; a média de UFC/m² foi maior na área externa quando comparada a área interna dos travesseiros dos pacientes e dos controles; a diversidade e a quantidade de microrganismos foi superior nos travesseiros dos pacientes quando comparados aos controles, os mais frequentes foram *Candida parapsilosis*, *Cladosporium* sp., *Mycelia sterilia* e *penicillium* sp.; nenhum tipo de enchimento foi considerado ideal, mas, entre os dos pacientes, o que apresentou menor nível de contaminação foi o de pena; em relação ao controle foi o de viscoelástico; todas as cepas de fungos enviadas para o sequenciamento foram confirmadas quanto ao gênero, exceto em relação ao *Paecilomyces* spp. Em relação à espécie, estes se revelaram diferentes dos que identificamos, com exceção *Penicilium* sp. , *Rhodotorula mucilaginosa* e *Alternaria alternata*. **Conclusão:** É possível que a bateria de testes alérgicos para fungos tenha que ser adaptada à realidade local e regional e que os travesseiros podem funcionar como um bioindicador que contaminação por fungos dentro dos domicílios.

ABSTRACT

Study on fungus prevalence in pillows of children with rhinitis and, or, asthma

Introduction: The increasing interest in allergenic microorganisms, the search for new reservoirs in addition to the interest in anemophilous fungi, their high frequency and diversity as well their association with allergic diseases motivated this study. Fungal identification and quantification in pillows can lead to advancement in diagnosis and in environmental measures. **Objectives:** To evaluate the occurrence of fungi in pillows of allergic children, the environment and the issues involved. **Methods:** Patients from the Immunology and allergy outpatient unit of the Botucatu University Hospital completed a questionnaire with epidemiological and clinical data, and the pillows used by the children were collected from their homes and placed in a sterile plastic bag; three new pillows were acquired for control. All the pillows were brought to the Mycology Laboratory of the Biosciences Institute and aspirated within a flow chamber by an MAS-100NT[®] air sampler for five minutes on each area – external and internal. Three plates were used for each aspirate with three different culture media. Fungi were identified by conventional mycological methods, and DNA extraction and sequencing were also performed. **Results:** All the participants were from different regions of Botucatu; 4.46% of the patients from the Immunology and Allergy Outpatient Unit who underwent the sensitization test were positive for the tested fungi; most of the patients were sensitized to more than one allergen, of which the most frequent were: *Dermatophagoides Farinae*, *Dermatophagoides Pteronyssinus*, *Blomia tropicalis* and fungi; 80% of the patients had rhinitis, and 50% also had asthma. None of the environments evaluated at the patients' homes showed to be adequate for allergic patients; only two pillows had an adequate cover and were visibly clean; all the patients' pillows were contaminated with fungi and, in some of them, the presence of gram positive bacteria and bacilli was found both in the external and in the internal areas; all the controls pillows were contaminated with fungi, but according to their manufacturers, they were all anti-allergic, anti-mite and anti-mould; the mean CFU/m² was statistically higher in the pillows that had been used for over seven years. The best evaluated culture medium was SDA, which showed to be superior to the other media; however, if only one medium had been used, many microorganisms would not have been identified. The mean CFU/m² was statistically higher in the external area as compared to the internal area of the patients' pillows and of controls; the diversity and

quantity of microorganisms was greater in the patients' pillows when compared to controls; the most frequent were *Candida parapsilosis*, *Cladosporium* sp., *Mycelia sterilia* and *penicillium* sp.; no stuffing type was considered to be ideal, and among the patients' pillows, the stuffing showing the lowest contamination level was that made of feathers; as regards controls, the least contaminated stuffing was that made of viscoelastic foam. All the fungal strains sent for sequencing were confirmed as regards genus, except for *Paecilomyces* spp. As concerns species, they showed to be different from those identified, except for *Penicilium* sp., *Rhodotorula mucilaginosa* and *Alternaria alternata*. **Conclusion:** The battery of allergy tests for fungi may need to be adapted to the local and regional reality, and pillows may function as a fungal contamination bioindicator at home.

1.0 - INTRODUÇÃO

Desde os primórdios, o homem busca segurança, quer seja física, alimentar, afetiva, e nesta trajetória desenvolveu o conforto e a capacidade de modificar o ambiente que o cerca.

Novos paradigmas se estabeleceram, e o homem tornou-se refém de suas conquistas, em um ambiente no qual interage, sempre, com o que vê e com o que não vê, sendo por vezes carrasco consciente, e outras vítimas inocentes.

Para dar conta destas mudanças, ocorreram respostas indesejáveis, para o homem, como tentativa de manter-se vivo, ainda que, desenvolvendo doença.

O homem descobre-se um ser imunológico, imerso em um mundo de vida macro e microscópico, em constante interação. O homem descobre-se atópico, alérgico, espirra e tosse.

E dizem: é doença do progresso.

O estilo de vida das sociedades modernas e industrializadas, com predomínio do sedentarismo e permanência em ambientes domésticos por até 80% do seu tempo ¹, têm contribuído para aumentar a prevalência de doenças alérgicas, particularmente asma e rinite, relacionadas ao alto grau de sensibilização a alérgenos domiciliares². Este estilo está associado às alterações ambientais e comportamentais, tais como: aumento da temperatura global; diminuição da ventilação nas cidades, edifício, e dentro dos domicílios; utilização de carpetes e tapetes que retém poeira; uso de ar condicionado; permanência das crianças por mais tempo em casa, em frente à televisão ou aos computadores; excesso de higiene, ou limitada exposição a antígenos microbianos.

Nos domicílios, a fumaça dos cigarros e o gás de cozinha são agravos que obtêm maior impacto à medida que os ambientes sofreram progressiva redução na dimensão. Ao lado disso, frequentemente há escassa insolação que promove a umidade e o aumento do alérgenos inaláveis.

A exposição, única e isoladamente, não é condição suficiente para causar sensibilização alérgica, porém estudos mostram que a exposição de crianças a elevadas concentrações de alérgenos de poeira doméstica é fator significativo para desenvolvimento posterior de asma ³, e que a intensidade da exposição e a inalação contínua, mesmo em pequenas quantidades, favorecem a sensibilização⁴.

No Brasil são, no mínimo, 16 milhões de pessoas alérgicas, sendo que até os 13 anos de idade a prevalência de rinite é de quase 30%, de asma 15%, enquanto de dermatite atópica chega a 6%⁵.

Atualmente, muitos países têm desenvolvido técnicas de avaliação das doenças alérgicas, quer em estudos epidemiológicos - na melhoria de detecção e de diagnóstico correto e adequado, quer nas implicações nos custos individuais e sociais. Em termos econômicos, estima-se que o custo anual, por paciente asmático, varia entre U\$ 326,00 na Austrália a U\$ 1315,99 na Suécia^{6,7}, sendo fácil deduzir as enormes somas despendidas anualmente quando nos lembrarmos das prevalências descritas acima. Outro dado importante em relação à rinite alérgica é que ela é uma das doenças que mais fazem o paciente procurar o médico nos Estados Unidos da América (EUA), e estimam-se seus custos anuais em U\$ 3 bilhões⁸.

O aumento da prevalência das doenças alérgicas, ainda não é totalmente compreendido, tem estimulado um grande número de estudos epidemiológicos, que descrevem os padrões de doenças em uma determinada população, definem as características e comportamento de pessoas em situações de risco, além de identificarem os fatores associados a risco, sugerindo, quando aplicável, possibilidades de prevenção.

Um número expressivo de alérgenos tem sido associado a diversas formas de alergia e relatados em todo o mundo. A concentração de alérgenos no ambiente doméstico varia muito e merece destaque, por serem frequentemente relatados os ácaros, os epitélios de animais, os antígenos de barata e os fungos⁹. Há evidências de que a exposição ambiental ao mofo, ou derivados proteicos destes, pode desencadear alergia IgE mediada, notadamente asma e rinite, em indivíduos predispostos¹⁰.

A alergia ou doença de hipersensibilidade é definida como a resposta exagerada do sistema imunológico a proteínas estranhas¹¹. Para se defender destas substâncias, o organismo ataca, via reações mediadas por anticorpos, provocando asma, dermatite atópica, rinite e rinoconjuntivite. Se, por um lado os anticorpos protegem, por outro lado, sua produção excessiva contra os antígenos agride, fazendo o organismo liberar, quando estimulado, entre outras substâncias, a histamina, desencadeando os sintomas da alergia. Todas as reações alérgicas IgE mediadas exigem a pré-sensibilização ao antígeno ou alérgeno⁵. Nem todos os indivíduos desenvolvem alergia, mesmo após ampla exposição aos alérgenos, o que sugere uma forte evidência de predisposição genética para atopia. Clinicamente, os sintomas apresentados são espirros, corrimento nasal, tosse e obstrução reversível das vias aéreas pulmonares.

Angiedema, urticária e anafilaxia também podem ocorrer nesses pacientes ¹². A alergia desenvolve-se, portanto, como resultado de múltiplas interações entre o sistema imune e agentes ambientais.

Em um estudo com crianças de nove a 18 anos de idade, em San Diego, Califórnia, EUA, a exposição de esporos de fungos resultou num aumento de 10 a 30% nos sintomas, para cada 1000 esporos por m³ de ar ¹³. Além disso, as epidemias sazonais de asma têm sido relatadas na Inglaterra e na Nova Zelândia durante períodos de alta contagem de esporos, e níveis elevados de ascomicetos têm sido associados com asma epidêmica na Inglaterra ¹⁴.

Segundo Horner et al.¹⁴, em 1995, nos Estados Unidos, e em outros países industrializados, 20% da população apresentava doenças alérgicas como asma e ou rinite causadas por aeroalérgenos - entre eles os fungos. Apesar de os fungos terem reconhecida participação em quadros de hipersensibilidade do trato respiratório, as publicações sobre a presença de fungos na atmosfera e nos ambientes domiciliares das cidades brasileiras são reduzidas ^{16,14,18}. Com isso, atualmente, há grande dificuldade na caracterização da importância dos alérgenos de fungos em quadros de asma e rinite alérgica. Em parte, isto se deve ao desconhecimento da microbiota fúngica a que a população está exposta.

Várias causas têm sido implicadas no aumento das doenças alérgicas, que chegaram a dobrar a cada década, nos últimos 20 a 30 anos, apresentando nítidas diferenças na prevalência de asma alérgica entre populações de estilo ocidental, urbanas ou rurais¹⁹. Na Europa, a rinite alérgica era considerada rara até o início do século 20, mas nas últimas décadas foi considerada uma verdadeira epidemia da revolução pós-industrial ²³. Com o crescente número de pacientes com asma, houve incremento das morbidades, maior absenteísmo escolar e no trabalho, redução da produtividade e maior utilização dos seguros saúde.

Burr et al.²¹, realizaram estudo, comparando populações escolares do mesmo grupo etário, no sul do país de Gales, em um intervalo de quinze anos e, encontraram um aumento de asma de 6 para 12% e em dermatite atópica de 5 para 12%. Ainda que não possa precisar quais os fatores que tenham contribuído com o aumento das enfermidades nas últimas três a quatro décadas, existem dados sugerindo que, em grande parte, eles se devam às mudanças nas condições de vida, em associação com a poluição ambiental.

Aberg et al ²² avaliaram a prevalência de asma , rinite e eczema em crianças de sete anos, entre 1979 e 1991 na Suécia, mostrando um aumento na prevalência de asma de 2,48% para 5,71%, com aumento de até duas vezes em todas as doenças alérgicas.

Na América do Sul, poucos estudos epidemiológicos sobre asma foram desenvolvidos antes dos anos 90, em parte pelo maior impacto das doenças infecciosas agudas nessas populações, e as dificuldades inerentes a estudos epidemiológicos em países dessa região. Carandina²³ em 1986, descreveu a prevalência de sintomas sugestivos de doenças respiratórias crônicas na população urbana de Botucatu – São Paulo, determinando a prevalência de asma em 5,3% , especialmente em menores de 15 anos, concluindo que a escassez de dados referentes a doenças pulmonares crônicas no Brasil impõe a necessidade de novos inquéritos epidemiológicos, que possibilitem a comparação dos resultados.

A sensibilização a fungos pode estar relacionada com o desenvolvimento e agravamento de asma e ao risco de aparecimento de outras doenças alérgicas em indivíduos atópicos; assim é importante conhecer quais os indivíduos sensibilizados numa certa população, principalmente entre alérgicos ²⁴.

Em relação aos aeroalérgenos, a sensibilização aos alérgenos intradomiciliares parece ser mais importante que os extradomiciliares, com maior desenvolvimento de asma nos casos onde o nível de aeroalérgenos é mais elevado e, assim, a exposição ocorre precocemente ²⁵. Poluição intradomiciliar é de grande importância uma vez que em países industrializados os indivíduos passam mais de 80% do seu tempo dentro de casas e edifícios, como dito anteriormente. Vários autores mostraram a relação da exposição a aeroalergenos tanto na sensibilização quanto nas manifestações clínicas de asma e outras alergias ^{17,26, 27}. Em estudo realizado na França, observou-se que proteínas oriundas de diversos gêneros de fungos presentes no domicílio de asmáticos eram responsáveis por 14,6% de sensibilização entre tais indivíduos, precedidos pelos ácaros da poeira doméstica e epitélios de animais, evidenciando, assim, a importância dos fungos na patogênese desta doença ²⁸.

O desenvolvimento de técnicas para medida de exposição ambiental aos alérgenos possibilitou uma série de estudos epidemiológicos. Essas pesquisas resultaram em fortes evidências, em diferentes partes do mundo, de que a sensibilização e a exposição aos alérgenos domiciliares são fatores primários na asma, particularmente em crianças e adultos jovens. Assim, a redução da carga alérgica intradomiciliar pode

constituir-se na primeira linha anti-inflamatória de tratamento²⁹. Portanto, é importante o desafio de criar um ambiente livre, ou com o mínimo possível de alérgenos nas residências dos pacientes.

Em estudos feitos no Brasil, no Estado de Minas Gerais³⁰ foram identificados os seguintes gêneros de fungos no ambiente domiciliar, por ordem de frequência: *Cladosporium* (90,3%), *Penicillium* (64,7%), *Aspergillus* (58,6%), *Curvularia* (33,3%), *Pullularia* (31,9%) e *Epicoccum* (31%). Foi também utilizado o teste cutâneo de hipersensibilidade, quando pela primeira vez se encontrou frequência elevada de sensibilização ao gênero *Alternaria* (21,1%) fato que, até então, não havia sido relatado no Brasil³¹. Outro estudo para avaliar hipersensibilidade ao mofo, realizado no Estado de São Paulo³² demonstrou baixa frequência de positividade aos testes cutâneos para fungos com extratos de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* em pacientes com asma e ou rinite, apesar de nos pacientes apenas com asma os índices serem discretamente mais elevados (7,28%) do que nos pacientes com rinite isoladamente (5,75%).

Em Recife³³, em 1958, foram identificados por ordem de frequência de isolamento no ambiente os gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Curvularia* e *Candida*. Posteriormente, em 12 áreas nessa cidade, em 1979 e em 1983, verificou-se que os fungos mais frequentemente isolados no ar atmosférico foram: *Aspergillus* (58,9%), *Penicillium* (41,4%), *Cândida sp.* (30,6%), *Cladosporium* (20,8%), *Fusarium* (19,6%), *Phoma* (19,4%) e *Curvularia* (18,9%)³⁴.

Exposição a fungos ocorre primariamente em ambientes externos, mas eles penetram em interiores e colonizam materiais ali encontrados, resultando em exposição domiciliar e ocupacional. Como são nutrientes para ácaros micófagos, a contaminação por fungos dentro das residências aumenta a população destes, como consequência temos aumento no número de alérgenos³⁵.

Os principais fungos alergênicos são as espécies pertencentes aos gêneros: *Alternaria*, *Aspegillus*, *Aureobasidium*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Fusarium*, *Gliocladium*, *Helminthosporium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phoma*, *Scopulariopsis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichophyton*, *Trichothecium*, *Ulocladium*, *Saccharomyces*, *Cândida*, *Epicoccum* e *Stemphylium*. No ambiente domiciliar, encontra-se, com maior prevalência para a espécie de *Aspegillus* e *Penicillium*, enquanto espécies de *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Alternaria* e *Fusarium* podem ser encontrados tanto dentro como fora do domicílio³⁶.

Quando comparadas as pesquisas sobre exposição com estudos de sensibilização a mofo domiciliar, há várias diferenças nos resultados, indicando a complexidade do assunto. Em estudo de exposição, Guneser et al.³⁷ na Turquia, em 1994, realizaram a coleta gravitacional em placas de petri no ambiente, em que 26 espécies de fungos foram isoladas, sendo o gênero *Penicillium* o mais frequente (29,6%), seguido por *Mucor* (23,9%), *Aspergillus niger* (22,2%), *Rhizopus* (19,8%) e *Alternaria* (19,8%). Em ambiente domiciliar na Polônia, *Penicillium* e *Aspergillus* foram os gêneros mais comumente encontrados³⁸. Em relação aos estudos de sensibilização, o gênero *Alternaria* foi identificado como o principal fungo causador de hipersensibilização na Espanha³⁹, enquanto na Dinamarca⁴⁰ o *Cladosporium* tem ocupado lugar de destaque. No Japão, desde a década de 1960 já tinha sido observado um aumento de positividade nas crianças asmáticas através dos testes cutâneos para fungos⁴¹. Também no Brasil, algumas pesquisas foram realizadas com taxas de sensibilização situando-se acima de 30%, e são também para fungos mitospóricos que aparecem com maior frequência²⁷. Portanto, existem vários relatos de sensibilização a fungos, e os dados indicam que a prevalência está aumentando.

A concentração de esporos de fungos no meio ambiente depende de muitos fatores, incluindo condições climáticas e vegetação. Os tipos e prevalência de fungos presentes em ambientes fechados, dentro dos domicílios, dependem da umidade, ventilação, presença ou ausência de carpetes, animais de estimação e plantas. A contagem de esporos de fungos em ambientes fechados, e no ar livre, varia consideravelmente dependendo de vários fatores, e entre eles os ambientais, a ventilação, o número de pessoas que ocupam o ambiente, a natureza e o grau de atividade exercida por essas pessoas, bem como a umidade relativa do ar^{42,43}. No ambiente exterior, os principais fungos encontrados são *Alternaria* sp. e *Drechslera* sp., mas estes também têm sido relatados em alguns ambientes internos. Da mesma forma, *Penicillium* sp. e *Aspergillus* spp. são encontrados tanto em ambientes fechados quanto em ar livre, embora com menor frequência do que relatado em ambientes internos. Outros fungos, como *Cladosporium* spp, *Epicoccum* sp. e *Fusarium* spp., têm sido relatados tanto em ambientes internos, como nos externos. Estudos de contaminação do ar de interiores e exteriores são necessários para definição da flora fúngica para avaliar as alergias nos pacientes de diferentes locais geográficos^{11,42,44,45,46,47}, pois alguns destes fungos podem causar reações alérgicas ou tóxicas, enquanto outros podem causar infecções em indivíduos suscetíveis³².

Nos vários estudos analisados, o número de esporos e a atividade da doença, na grande maioria dos casos, não podem ser correlacionados ^{43,48}. A concentração de esporos no exterior foi superior ⁴⁸ durante todo o ano, porém com variações sazonais significativas, observadas tanto em espaços interiores quanto no ar livre, com um total máximo no verão. As frequências de *Aspergillus* sp., leveduras, *Cephalosporium* sp. e *Gliocladium* sp. foram maiores no inverno e, esporos de *Penicillium* sp. foram mais comuns em ambientes fechados. Dados sobre a carga de esporos no ar e os níveis alergênicos associados, em ambos os ambientes interiores e exteriores, permanecem incompletamente caracterizados. Da mesma forma, orientações não concretas sobre a carga de esporos de fungos aceitáveis em diferentes ambientes estão disponíveis, porém são questionáveis ^{49,50}.

Estudos sobre a invasão e o impacto de fungos a sistemas biológicos em ambientes fechados é um assunto importante de saúde pública, que tem sido amplamente investigado por vários pesquisadores, visto uma crescente preocupação e significativas evidências sobre os grandes, e graves, efeitos à saúde dos ocupantes das habitações contaminadas, provocadas pela exposição a micotoxinas e esporos produzidos por fungos contaminantes destes recintos ⁵¹.

Desde muito tempo, conhece-se que os fungos do ambiente veiculado pelo ar atmosférico, desempenham papel importante como elemento alergizante. O grupo mais importante de fungos presentes no ar e que causam doenças respiratórias alérgicas nos seres humanos são os fungos produtores de conídios, os quais compreendem, na sua maioria, os deuteromycetes. A maioria dos esporos produzidos pelos fungos imperfeitos varia em tamanho, forma, textura, cor, número de células, espessura da parede celular, e métodos pelos quais eles estão ligados uns aos outros e aos seus conidióforos. A identificação dos fungos comuns é difícil, pois as características de colônias de fungos e até mesmo características microscópicas, variam de acordo com o meio em que o fungo é cultivado, a temperatura de incubação, variação de tensões e natureza pleomórficos de esporos ^{52,53}. Em geral, os fungos mais alergênicos reproduzem-se de forma assexuadas.

A habilidade dos fungos em causar doenças em humanos parece ser um fenômeno accidental, diagnosticada como infecções oportunistas e, com raras exceções estaria associada ao estado imunitário do indivíduo e a sua exposição ambiental, bem como a predisposição genética para o desenvolvimento de doenças alérgicas ⁵⁴. Vários deles também são aeroalérgenos que, quando inalados, podem ser responsáveis por manifestações respiratórias alérgicas, como asma e rinite. O homem, ao se expor

inalando estes aeroalérgenos, pode desenvolver uma doença respiratória alérgica e a intensidade de exposições pode determinar a relevância clínica. Para controlar as manifestações alérgicas provocadas por estes alérgenos através da terapêutica específica, capaz de alterar a história natural da doença, é importante conhecer a frequência e os possíveis locais em que ocorrem, em relação ao total de exposições do indivíduo ou pelo número de amostras isoladas^{55,56}.

Os fungos têm afetado a população humana através de várias maneiras, incluindo doenças em vegetais, animais e as micoses superficiais e sistêmicas. A produção de toxinas pelos fungos também está envolvida com doenças de hipersensibilidade, algumas delas associadas com a inalação de esporos, como a pneumonia, a pneumonite por hipersensibilidade, a síndrome da fadiga crônica e insuficiência renal⁵⁷.

Os fungos são muito resistentes, podendo sobreviver por longos períodos em condições adversas. O crescimento vegetativo desses seres ocorre de forma eficaz principalmente entre 18 a 32° C e, embora não esporulem abaixo de zero grau, podem permanecer viáveis, em estado latente, em temperaturas negativas (-45 a -55° C) ou até menos. Temperaturas acima de 75° C geralmente são letais para fungos, porém existem alguns fungos termófilos que não esporulam abaixo de 45° C³².

Uma característica comum dos fungos é a enorme quantidade de esporos produzidos pela maioria. Uma única colônia de 2,5 cm de diâmetro de *Penicillium* pode gerar até 400 milhões de conídios. Entretanto, não mais do que alguns esporos de cada indivíduo irão ter sucesso em suas funções reprodutivas e, assim, não há um aumento marcante no sítio ocupado por esta espécie, embora possa haver variações de seu número de ano para ano⁵⁸. A intensidade luminosa também pode afetar algumas espécies, como alguns tipos de *Cladosporium*, que necessitam para seu crescimento de períodos de escuridão alternados com a luz⁵⁹.

Fungos são micro-organismos ubíquos, têm como habitat os mais diferentes substratos. A grande maioria vive no solo, nos vegetais, nos animais, no homem, em detritos, na água, sendo participantes ativos no ciclo dos elementos na natureza. Seu principal meio de dispersão é o ar atmosférico, através dos ventos, podendo também ser espalhados pelos animais, homem, insetos, água. Alguns fungos desenvolvem-se em meios de cultivo especiais onde formam colônias do tipo leveduriformes ou filamentosas^{52,53}.

As colônias leveduriformes são, de modo geral, pastosas ou mucoides e assim caracterizam o grupo das leveduras, ou dos fungos filamentosos dimórficos, enquanto as colônias filamentosas, que caracterizam os bolores, podem apresentar-se algodonosas, aveludadas ou pulverulentas e com os mais variados pigmentos^{52,53}.

A identificação de fungos filamentosos pela metodologia convencional está baseada, principalmente nas características fenotípicas macro e microscópicas e ultra-estruturais. A identificação de espécies é, classicamente, realizada mediante a observação das estruturas reprodutivas assexuadas ou sexuadas que os fungos exibem nos diferentes meios de cultivo, sendo necessária sempre a utilização de chaves de classificação. Uma das limitações do método clássico é que na presença de condições nutritivas favoráveis, frequentemente o fungo não produz suas estruturas reprodutivas, o que pode levar a um diagnóstico errôneo do agente etiológico em questão. Novas opções de identificação, como utilização de métodos moleculares, têm sido descritas para superar as limitações dos métodos de identificação tradicionais, os quais utilizam longos períodos de identificação, inaceitáveis para a iniciação da terapêutica utilizada principalmente nas infecções invasivas⁶⁰. Tornam essencial o desenvolvimento de métodos específicos, sensíveis, rápidos e seguros.

Recentemente, diferentes métodos com aplicação da biologia molecular têm sido citados para suprir essas necessidades. A reação da cadeia polimerase (PCR) tem sido uma das mais executadas, uma vez que constitui técnica que permite uma rápida identificação de fungos patogênicos causadores de diversas doenças. Essa técnica também possibilita mostrar uma coleção de culturas pertencentes à mesma espécie e, sua relação genética^{61,62,63,64}.

Os fungos crescem rapidamente em qualquer época quando as condições são favoráveis. Dentro das casas, os fungos se desenvolvem com maior intensidade em recipientes para depositar lixo, lugares de armazenamento de alimentos, estofados, papel de parede, cortinas de pano, porões, ar condicionado, roupas de couro, entre outros⁶⁵.

Atualmente pouco se sabe sobre a distribuição dos fungos dentro das casas, principalmente qual a concentração fúngica em alguns materiais de uso constante, e diário, que pudessem ser reservatórios importantes e facilitadores de sensibilização, e desencadeamento de crises alérgicas. Áreas úmidas, como chuveiro, frequentemente abrigam *Cladosporium* sp.; condicionadores de ar e umidificadores são fontes importantes de *Rhizopus* sp., *Mucor* sp, *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.^{65,66}. Sabe-se

que maiores exposições a esporos de fungos, com contato intenso e próximo, aumentam o risco do desenvolvimento de crises rinite e de asma persistente, como já salientado anteriormente^{66,67,68}. Porém, é importante ressaltar que existem diferenças entre a população de fungos predominantes no ambiente domiciliar e no ar atmosférico extradomiciliar¹⁴.

Cobertores, edredons, colchões e travesseiros podem fazer parte dos reservatórios de alérgenos, entre eles os fungos, que podem causar a sensibilização que leva a produção de IgE e manifestações alérgicas. As crianças têm maior tempo para a exposição, caso utilizem estes utensílios⁶⁶.

Os travesseiros sintéticos, muito utilizados no Brasil, são um risco para a prevalência de fungos e severidade da asma^{31,66}. Buttand et al⁶⁹ estimaram que um aumento no uso de travesseiros sintéticos poderia explicar o aumento e 50% da prevalência de sibilos. Considera-se que os fungos se desenvolvem nos leitos e que um adulto pode produzir 100 litros de suor por ano, durante oito horas de sono a uma temperatura de 30° C, sendo este um ambiente propício para o crescimento de fungos. A contaminação em travesseiros e acolchoados, já era uma preocupação desde 1936⁷⁰, porém poucos estudos existem sobre esta relação e o aumento da prevalência de asma e rinites.

A maioria dos pacientes com asma apresenta testes cutâneos positivos no mínimo para um aeroalérgeno, e alguns estudos sugerem que as manifestações clínicas da doença são reduzidas quando adotadas medidas de controle ambiental, que diminuam a exposição alergênica, porém é tema controverso^{14,70}.

Apesar de existirem dados conflitantes sobre a efetividade do controle ambiental na criança já sensibilizada, a maioria dos estudos é oriunda apenas de análises de determinado aspecto do controle do ambiente com medida isolada, nem sempre refletindo o que ocorre no mundo real do paciente. Assim, a redução da carga alergênica intradomiciliar pode constituir a primeira medida de prevenção e, portanto, é importante o desafio de criar um ambiente livre, ou pelo menos com concentrações não sensibilizantes de alérgenos nas residências dos pacientes⁸⁵. Além disso, muitas pesquisas são insuficientemente controladas, uma vez que algumas apresentam amostra de tamanho reduzido e outras analisam medidas não suficientemente agressivas para reduzir a exposição^{72,73,74}. Na prática clínica, raramente se conseguem resultados satisfatórios, em qualquer tratamento de alergia respiratória, em que o controle ambiental não seja parte integrante e ativa. O conhecimento de quais alérgenos causa

hipersensibilidade ao paciente e daqueles que se encontra em maior quantidade no habitat do asmático, tem sido de fundamental importância na educação sobre a doença e na orientação sobre controle ambiental ^{75,76}. O revestimento dos colchões e travesseiros com material impermeável é possivelmente a medida de controle ambiental mais importante e simples, visto que já está comprovado ser estes locais os maiores reservatórios de ácaros domésticos ^{72,77,78}.

Como citado anteriormente, a exposição precoce aos alérgenos de fungos e ácaros da poeira doméstica, é considerada crucial para a sensibilização. De maneira oposta, a interrupção do processo de sensibilização primária a agentes inaláveis pode protelar ou prevenir o aparecimento de doenças alérgicas ⁷⁹. Os primeiros meses de vida parecem ser um período de vulnerabilidade à sensibilização das crianças quando expostas a alérgenos domiciliares, principalmente da poeira doméstica ⁸⁰. A adoção de medidas preventivas, evitando-se a exposição e consequentemente a sensibilização dos indivíduos com alto risco ao desenvolvimento de sintomas alérgicos, pode reduzir os gastos com estas doenças, e garantir melhor qualidade de vida.

Apesar de todas as evidências citadas, a importância dos fungos na etiopatogenia das doenças alérgicas respiratórias é frequentemente subestimada, uma vez que existe dificuldade em se padronizar extratos, quer para testes cutâneos, quer para dosagens séricas de IgE específicas ^{7,81}.

Com base em estudos que tiveram grande repercussão na literatura médica científica, foram propostas e desenvolvidas baterias de testes com extratos padronizados, para identificar pacientes sensibilizados a distintos alérgenos, entre eles os fungos que, entretanto, apresentam variações geográficas, e podem não ser representados, nestas baterias, aqueles que sensibilizam pacientes, mas não foram incluídos nos estudos de maior repercussão.

Testes cutâneos de alergia para diagnóstico de doenças mediadas por anticorpos IgE constituem método sensível para detecção de sensibilização a alérgenos. Podem ser realizados por técnica percutânea ou intradérmica. Um teste positivo é função da presença do anticorpo IgE, da liberação de mediadores químicos dos mastócitos, da reatividade da pele à histamina e da quantidade de alérgeno usada. Junto a uma história clínica cuidadosa, os testes cutâneos são úteis para determinar a natureza alérgica dos sintomas dos pacientes, avaliar o grau de sensibilidade, estabelecer causas específicas dos seus sintomas e dirigir o tratamento por meio de medidas para reduzir a

exposição aos alérgenos e na seleção do antígeno relevantes para o tratamento de alergias^{3,82,83}.

Considerando-se o estilo de vida que favorece a sensibilização alérgica e a ocorrência de alérgenos em locais pouco pesquisados, além do caráter epidemiológico e do crescente número de pessoas alérgicas, principalmente asma e rinite, torna-se importante incrementar os estudos visando melhor conhecer a realidade da presença fúngica no cotidiano das pessoas, particularmente em seu ambiente doméstico. Dessa forma, está inserida a presente proposta de pesquisa, de estudar os fungos presentes em travesseiros, bem como os problemas envolvidos e que podem ser relacionados com a presença de fungos neste local, permitindo avanços nestas questões.

Considerando-se o estilo de vida, as condições ambientais, o tempo de permanência em contato com o travesseiro - maior entre as crianças, o fato de que a sensibilização é precoce, o presente estudo tem como objetivo avaliar a presença de fungos em travesseiros de crianças alérgicas, com rinite e, ou, asma e os aspectos epidemiológicos envolvidos.

2.0 - OBJETIVO

Avaliar a presença de fungos em travesseiros de crianças alérgicas, com rinite e, ou, asma e os aspectos epidemiológicos envolvidos.

2.1 - Objetivos específicos

- Avaliar a prevalência de fungos em travesseiros de pacientes com diagnóstico prévio de alergia, rinite e, ou, asma alérgica atendidos no Ambulatório de Imunologia e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP;
 - Avaliar as condições do ambiente em que estas crianças moram, bem como dos travesseiros que estavam sendo utilizados ;
 - Identificar e quantificar os esporos de fungos presentes nos travesseiros;
 - Correlacionar os fungos identificados nos travesseiros dos pacientes com a positividade ao teste de hipersensibilidade cutânea imediata já realizados nesta população no Ambulatório citado ;
 - Verificar a relação entre os principais gêneros sensibilizantes e seu potencial alergênico nestas crianças;
 - Realizar a identificação molecular pelo sequenciamento gênico da região de rDNA 5.8S-ITS dos isolados que se mostrarem particularmente importantes como indutores de processos alérgicos e, ou , pela dificuldade ou novidade micológica .
-

3.0 – SUJEITOS E MÉTODOS

3.1 - Sujeitos

Foram avaliados 238 prontuários de crianças com rinite e, ou, asma, com teste alérgico positivo e residentes na cidade de Botucatu, no período compreendido entre 01 de setembro de 2005 a 31 de agosto de 2006. A identificação ocorreu a partir do livro de registro do Ambulatório de Imunologia e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu e dos seus respectivos prontuários.

Dos 238 prontuários consultados, 13 (5,46%) tinham teste alérgico positivo para fungos e destes, 10 foram encontrados no endereço que constava no prontuário. Assim, fizeram parte do estudo todos os 10 pacientes da cidade de Botucatu, com diagnóstico prévio de alergia respiratória- rinite e, ou, asma, atendidos no ambulatório de Imunologia e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu- UNESP, com teste alérgico positivo para fungo.

Todos os pacientes ou responsáveis que concordaram em participar do estudo, foram entrevistados, através de visita domiciliar, sobre os aspectos do ambiente domiciliar (anexo I) como forma de identificar possíveis fatores de risco e, em seguida foi coletado o travesseiro.

Quanto à avaliação do controle ambiental, foi utilizado o Guia de Avaliação Ambiental do Alérgico, criado pelo Centro de Orientação em Rinite Alérgica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CORA), integrado no anexo I ⁸⁴, o qual consiste em um formulário construído para avaliar o ambiente do domicílio do asmático, onde se encontram perguntas variadas sobre agravantes ambientais da asma, tais como a presença de carpete, de cortina, de tapete, aspectos relativos à cama, e se esta possui acessórios inadequados como almofadas, bichos de pelúcia ou cobertor que solta pelos. Há também questões sobre o ambiente: se é arejado, úmido, ou com manchas de mofo nas paredes. Ainda é verificado se alguém fuma no domicílio, se há convívio com animais, se há plantas com xaxins, e ainda outros possíveis agravantes ambientais. Através de questões semelhantes podem ser avaliados o quarto e a sala que são as áreas do domicílio onde o paciente com asma permanece por maior tempo. Esse formulário permite que o entrevistador, estando no domicílio do paciente, detecte e anote os agravos ambientais observados. Isso é importante porque reforça a veracidade das informações obtidas,

uma vez que a entrevista foi realizada na casa do paciente, e o entrevistador pôde observar e avaliar o ambiente e a resposta do familiar simultaneamente.

Cada questão traz quatro alternativas. As mães, ou responsáveis pelas crianças, escolhem uma das alternativas e o entrevistador, observando o ambiente, confirma, ou não, a resposta. Há, no final de cada parte, um espaço destinado ao registro do total de pontos obtidos. O mesmo se observa no final do formulário, onde se registra o total de pontos resultante da soma de todas as partes. Criou-se, a partir daí, um escore, variando de 0 a 50. De 0 a 15 pontos, o ambiente é tido como adequado; acima de 15 pontos, o ambiente é considerado como inadequado. Para ser avaliado como ambiente adequado, o quarto de dormir e a sala do domicílio deveriam estar livres de carpetes, cortinas, tapetes, almofadas, animais e irritantes das vias aéreas, e apresentar travesseiro com capa, cobertor, quando existente, do tipo edredom, móveis essenciais (cama, guarda-roupa) e teto sem umidade. Essas características resultam em uma soma menor que 15 pontos. Por outro lado, no ambiente inadequado, a presença desses agravos excede os 15 pontos. Assim, quanto menor o total geral da pontuação, menor o índice dos possíveis fatores desencadeantes de asma presentes no ambiente.

3.2 - Métodos

3.2.1 - Coleta dos travesseiros dos pacientes

Os travesseiros foram coletados nos domicílios e imediatamente substituídos por um novo fornecido pela pesquisadora.

Os travesseiros utilizados pelas crianças foram coletados e colocados em saco plástico estéril e, foram transportados até o Laboratório de Biologia de Fungos do Departamento de microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, onde foram analisadas as condições de limpeza, tipo de espuma, tipo de capa, e em seguida aspirados para análise microbiológica, sempre no mesmo dia da coleta (Figura I).

Os travesseiros foram retirados dos sacos plásticos e colocados em câmara de fluxo laminar, onde foram aspirados, com amostrador de ar MAS-100NT® - Merck por cinco minutos na sua parte externa e, posteriormente foram abertos com tesoura estéril e aspirada a sua porção interna, por igual tempo. Para cada travesseiro, foram utilizadas seis placas – três para área externa e três para área interna, contendo três meios de cultura diferentes.

Para controle do aspirado, após aspiração de cada travesseiro, era aspirado o ar da capela de fluxo, para descartar qualquer contaminação que não fosse oriunda do travesseiro.

Os meios de cultura utilizados foram Dichoran Rose Bengala Choramphenicol Agar (DRBCA), Sabouraud Dextrose Agar (DAS) e Batata Dextrose Agar (BDA)⁸⁵.

Empregou-se um amostrador microbiológico de ar da marca MERCK denominado MAS-100, um instrumento do tipo impactador, que aspira 100 litros de ar por minuto, através de uma placa perfurada. O ar aspirado, que contém as partículas presentes nos travesseiros, atingiu diretamente a superfície de uma placa de petri, que, após o ciclo da coleta ter-se completado, 5 minutos, foi retirada, selada com filme plástico e colocada em estufa a 25°C por um período de 4 a 7 dias.



Figura A

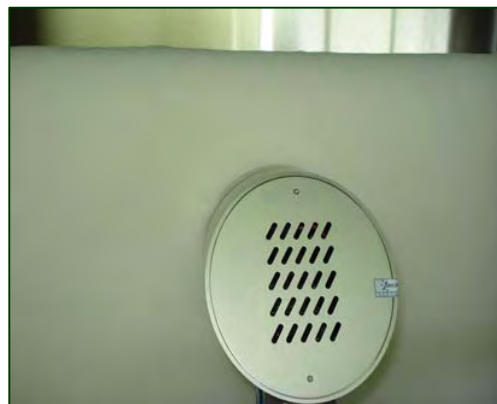


Figura B

Figura 1-A - Condições de amostragem dos travesseiros em capela de fluxo laminar, com o amostrador modelo – MAS-100 para coleta dos fungos e o método utilizado, cujo detalhe está apresentado na Figura 1-B.

3.2.2 – Travesseiros controle

Como controle do estudo foram utilizados três travesseiros novos, que foram comprados em lojas da cidade de Botucatu.

- Controle 1 – Travesseiro com enchimento de espuma flocada revestido de tecido 82% algodão e 18% poliéster, segundo o fabricante – antimfofo, antiácaro e antialérgico. Este foi o tipo de travesseiro entregue aos pacientes em substituição ao que nos foi cedido .

- Controle 2 - Travesseiro com enchimento de espuma compacta revestidos de tecido de 100% algodão, segundo o fabricante – antimoho, antiácara e antialérgico.
- Controle 3 - Travesseiro em viscoelástico , tipo NASA revestidos de tecido de a 82% algodão e 15% poliéster , segundo o fabricante – antimoho, antiácara e antialérgico.

3.2.3- Cultivo, contagem das colônias e identificação dos fungos

As placas com os meios de crescimento de fungos foram incubadas, em média, durante 4 a 7 dias à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Após o período de incubação, procedeu-se à análise das placas, bem como a contagem das colônias por metro quadrado de travesseiro, utilizando-se de uma lupa binocular, efetuando-se duas contagens a de fungos filamentosos e a de colônias de aparência cremosa - leveduras. Todo o material foi analisado por dois profissionais e, quando ocorreu discordância na análise, foi solicitada uma terceira avaliação, por outro profissional habilitado.

A contagem de colônia foi expressa em unidades formadoras de colônias por metro quadrado de travesseiro (UFC/ m^2), conforme esquema abaixo, considerando-se as duas áreas externas e a área interna .

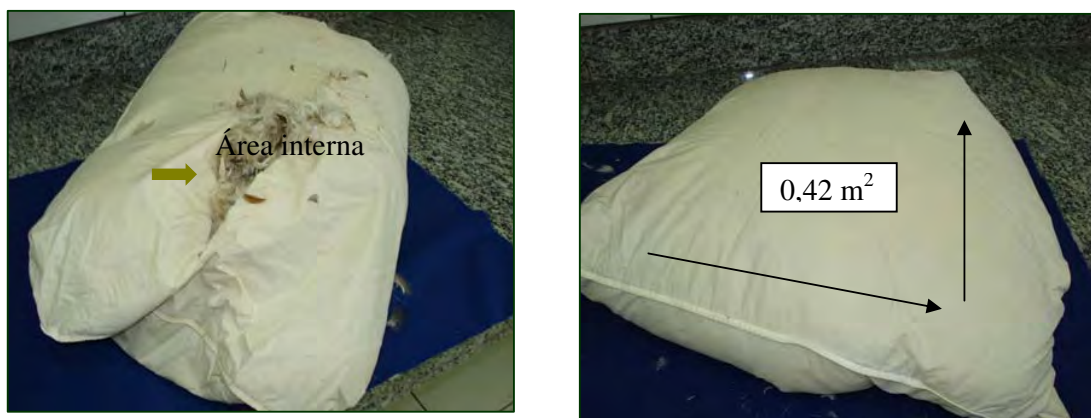


Figura 2 - Modelo utilizado para definição das coletas e das UFC m^2

Em cada placa, foram selecionadas colônias de fungos filamentosos e leveduras com aparência macroscópicas diferentes para isolamento. Tais colônias foram repicadas para tubos contendo 10 ml de meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar sólido inclinado. Todos foram colocados em estufa a 25°C , por sete dias.

Após o crescimento dos isolados, as culturas filamentosas foram submetidas às técnicas de colônias gigantes e microcultivo, para permitir melhor observação das colônias e de suas estruturas reprodutivas e, assim, poder identificá-los⁸⁶. Cada cepa foi semeada, com o auxílio de uma agulha de níquel-cromo, em três pontos da placa de Petri; estes pontos foram cobertos com lamínula esterelizada num ângulo de 45°. O conjunto foi colocado em estufa à temperatura de 25° C por sete dias. Após esse período, inativou-se a esporulação, adicionando 1 ml de formol ao algodão e vedando a placa com fita adesiva durante 24h-48h. O vapor de formol, além de inativar o fungo, auxiliou na fixação das estruturas microscópicas. Após retirou-se a lamínula com auxílio de uma pinça, uma vez que nela estavam aderidas as hifas e esporos do fungo. Pingou-se uma gota de corante azul de lactofenol-algodão e montou-se sobre uma lâmina. Desprezou-se o cubo de ágar e pingou-se outra gota de corante azul e a recobriu com uma lamínula, para visualizar esporos e hifas também estavam aderidos à lâmina. Observou-se em microscópio ótico Bx60 Olympus® com objetiva de 10, 20 ou 40 X, o tipo e cor da hifa, forma disposição e formação de esporos e, em seguida, fotografadas. O material observado foi comparado às descrições disponíveis na literatura⁸⁷. Observaram-se as estruturas reprodutivas ou outras estruturas fungicas características, aspectos das hifas e da parte superior e inferior das colônias gigantes – formato, textura, coloração, esporos.

Todo o material foi analisado por dois profissionais e, quando ocorreu discordância na análise, foi solicitada uma terceira avaliação, por outro profissional habilitado. Todas as colônias gigantes e as lâminas dos microcultivos foram fotografadas com máquina digital.

Para a identificação dos fungos filamentosos, foi realizada análise descritiva das características morfológicas dos cultivos tendo em vista os seguintes aspectos: textura, topografia, superfície, cor da colônia, pigmento, cor do pigmento, tempo de crescimento e diâmetro da colônia, estruturas do micélio reprodutivo, presença de macroconídeos ou microconídeos, ascocarpos, picnídios e conidióforos. Chaves de classificação foram utilizadas para identificação das espécies dos gêneros fúngicos isolados⁸⁸.

Para a identificação das espécies de levedura do gênero *Candida* isoladas, utilizaram-se placas com meio cromogênico – Chromagar *Candida*®, (Probac do Brasil®, São Paulo). Após semeadura da cepa nesse meio, há alteração da coloração da colônia dependendo da espécie de *Cândida* isolada. Após 48 horas de incubação a 30-

37°C, é possível a identificação de: *Candida albicans*, que se torna esverdeada, *Candida krusei*, rósea, *Candida tropicalis*, azul-acinzentada, e as demais espécies, róseo-esbranquiçadas. Todos os isolados foram estocados em ágar Sabouraud dextrose a 4°C e subcultivados por um período de 24 a 48 horas antes da inoculação em meio cromogênico, CHROMagarTM Candida (Microbiology, France). O CHROMagarTM Candida foi preparado de acordo com as instruções do fabricante e as placas foram estocadas a 4°C no escuro. Cada isolado foi subcultivado nesse meio e incubado a 30°C por 48 horas. A leitura das placas e a interpretação dos resultados foram realizadas pela observação da morfologia e da pigmentação das colônias⁸⁹.

3.2.4- Extração do DNA genômico

O procedimento de extração do DNA descrito a seguir foi feito de acordo com o protocolo utilizado por McCullough et al⁶⁴, com pequenas modificações.

Antes da extração, os fungos foram repicadas em tubos com agar Saboruraud dextrose a 25°C por 4 a 7 dias.

Com o auxílio de uma alça de platina previamente flambada, foi coletada uma pequena quantidade de células de fungo, diretamente do meio de cultura sólido. As células foram ressuspensas em tubos contendo 1ml de sorbitol 1M e EDTA 125mM com 500mg glass beads. A seguir, foi colocado em vortex por dois minutos e centrifugado a 13000g por 10 minutos a 25°C descartado o sobrenadante e ressuspensado o pellet em 500 µl tampão extração e protease 20 µl a 65°C em banho-maria durante toda a noite. Em seguida, foram adicionados 500 µl de acetato de sódio 3M e gelo por duas horas, centrifugado novamente 13000g por 10 minutos a 4°C desprezado o sobrenadante e lavado o pellet com 500ul de etanol 70% gelado, novamente centrifugado 13000g por 10 minutos a 4°C, desprezado o álcool e secado em estufa. Após foi ressuspensado em 500 µl de água miliQ (autoclavada) e mantido o DNA a menos 20°C.

3.2.5 - Tratamento das amostras com RNase

Após a extração do DNA, as amostras foram submetidas ao tratamento com RNase. Adicionou-se às amostras 2% do volume da amostra de RNase e as mesmas permaneceram em banho-maria a 37°C por 30 minutos.

3.2.6 - Análise do produto em gel agarose

O DNA extraído após ser submetido a tratamento com RNase foi analisado em gel de agarose a 1%. O gel consiste em 100mL de solução de TBE (108 g de tris, 55 g de ácido bórico, 40 mL de EDTA 0,5M, 1L de H₂O Miliq, pH 8,0) e 1 grama de agarose. Essa mistura foi dissolvida em forno microondas e, ao esfriar, adicionou-se 0,5 µL de brometo de etídeo para visualização da presença do DNA. Com auxílio de uma pipeta, o gel foi carregado com as amostras previamente preparadas. O gel foi corrido em cuba, em voltagem de 80 mV por 2 horas e, em seguida foi exposto ao transluminador com luz ultravioleta , fotografado e as imagens armazenadas em computador - Alpha Manager®.

3.2.7 - Reação de PCR

As amostras de DNA genômica foram submetidas à reação de polimerase em cadeia (PCR) para a amplificação enzimática do DNA. Este processo ocorre *in vitro*, através de primers de oligonucleotídeos complementar às fitas opostas do DNA desejado. Os primers utilizados possuíam a seguinte sequência de nucleotídeos ITS4 :TCCTCCGCTTATTGATATGC e ITS5: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG . A reação de PCR utilizada foi a seguinte : 4,0 µL de DNA; 3,0 µL de buffer de PCR; 6 µL de DNTP; 12 µL de primer ITS4, 12 µL de primer ITS5; 2,4 unidades da enzima Taq polimerase; 209,6 µL de água MiliQ. Os ciclos do PCR seguiram as seguintes condições : primeira extensão 94°C por 5 minutos; desnaturação 94°C por 1 minuto; anelamento 60°C por 2 minutos; 40 ciclos seguidos por uma extensão 72°C por 10 minutos em termociclador Mastercycler gradient eppendorf ® e mantidos a 4°C até o momento da visualização do material no gel de agarose,

3.2.8- Sequência do DNA

O sequenciamento de DNA foi realizado no Centro de Genoma Humano da USP a partir de produtos de PCR e plasmídios utilizando-se o ABI3730 DNA Analyser e , as reações de sequenciamento foram feitas utilizando-se BigDye® Terminator V3.1 cycle sequencing Kit. As corridas foram feitas em capilares de 36 cm utilizando o polímero POP7. As seqüências foram analisadas utilizando-se o software sequencing analysis 5.3.1, com um alcance, em média de 600 a 700bases.

O produto de PCR foi analisado em gel de agarose para verificar a presença de banda única, utilizando ExoSap IT®. Após, foram acrescentados 8µl de PCR, mais

0,5µl de exonuclease I e mais 1µl de shirmp alkaline phosphatase, após foi incubada em termociclador por uma hora a 37° C e 15 minutos a 80° C e conservado a 4° C. Após foram encaminhados em caixa apropriados para o Centro de Genoma da Universidade São Paulo.

3.2.9 - Análise das sequências completas.

As sequências de nucleotídeos correspondentes no formato FASTA, foram processadas com programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), usando a ferramenta BLASTEN (nucleotide sequence against nucleotide database sequences) disponível no NCBI. Como critério para identificação foram examinados todos os “ hits” com E- value 0.0 e com identidade acima de 98%.

3.3 - ASPECTOS ÉTICOS

Todos os pais ou responsáveis pelos pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (anexo2) que inclui : autorização para uso do prontuário, responder à entrevista, doação do travesseiros, com imediato recebimento de outro novo.

Aprovado no Comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP em 04/12/2006 sob o número ofício 601/2006- CEP.

3.4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística, considerou-se o nível de significância de $p < 0,05$.

Para comparar as unidades formadoras de colônia quanto ao tempo de travesseiro categorizado e ao controle, foi ajustado um modelo linear generalizado assumindo distribuição gama e função de ligação logarítmica usando PROC GENMOD do SAS versão 9.1.

Para estudar associação entre unidade formadora de colônia e o tempo de travesseiro (não categorizado), foi calculada e testada correlação de Spearman usando PROC CORR do SAS versão 9.1.

Para estudar associação entre as variáveis categorizadas (qualitativas), foi feito o teste de qui-quadrado usando o PROC FREQ do SAS versão 9.1.

4.0 – RESULTADOS

Foram avaliados 238 prontuários de pacientes com rinite e, ou, asma, com teste alérgico positivo e, residentes na cidade de Botucatu no período compreendido entre 01 de setembro de 2005 a 31 de agosto de 2006. A identificação destes pacientes ocorreu a partir do livro de registro do Ambulatório de Imunologia e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu e dos seus respectivos prontuários.

4.1- Aspectos epidemiológicos

A idade média dos pacientes foi de 12,2 anos, com um mínimo de 6 anos e um máximo de 17.

Dos 238 prontuários, 13 (5,46%) tinham teste alérgico positivo para fungos e destes, 10 fizeram parte do estudo. A maioria deles era sensibilizada a mais de um alérgeno testado, sendo os mais frequentes: *Dermatophagoides Farinae*, *Dermatophagoides Pteronyssinu*, *Blomia tropicalis* e fungos.

Dos 13 extratos alergênicos utilizado nos prick teste, observou-se baixo percentual de positividade para: *Cynodon dactylon*, epitélio de cão, *Blatella germanica*, pena mix – galinha, ganso, pato e pombo, pólen, tabaco e lã e, em nenhum dos pacientes foi positivo para epitélio de gato como podemos observar na tabela abaixo.

Tabela 1 – Distribuição dos pacientes que realizaram teste alérgico por punctura, segundo extratos alergênicos, positividade e média do diâmetro das pápula. Botucatu, 2010.

<i>Extratos alergênicos</i>	<i>Positividade</i>		<i>Diâmetro médio da pápula</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	
Controle negativo	10	100	1,28
Controle positivo	10	100	3,94
<i>Dermatophagoides farinae</i>	7	70	4,65
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	6	60	4,00
Fungos Mix II – <i>Alternaria</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> ,,	10	100	4,14
<i>Cynodon dactylon</i> – grama comum	2	20	3,60
Epitélio de cão	3	30	3,69
Epitélio de gato	0	0	3,72
Pena Mix – galinha, ganso , pato e pombo	3	30	3,70
<i>Blatella germanica</i> – barata de cozinha	4	40	4,20
<i>Periplaneta americana</i> – barata de esgoto	3	30	3,73
<i>Blomia tropicalis</i>	8	80	5,15
Pólen	1	10	3,60
Tabaco	2	20	3,60
Epitélio de carneiro - Lã	1	10	4,2

Quanto ao diagnóstico médico, exceto um deles, todos os demais tinham rinite, sendo que 50% também tinham asma, como podemos observar na tabela 2.

Tabela 2 – Distribuição dos pacientes, segundo diagnóstico médico de gravidade da asma que constava no prontuário. Botucatu, 2010.

<i>Diagnóstico médico</i>	<i>número</i>	<i>%</i>
Asma persistente grave e rinite	1	10
Asma persistente moderada e rinite	2	20
Asma persistente leve e rinite	2	20
Asma intermitente	1	10
Rinite	4	40
<i>Total</i>	<i>10</i>	<i>100</i>

Em relação ao inquérito ambiental, nenhum ambiente revelou-se inteiramente adequado para pacientes alérgicos, principalmente quanto à presença umidade nas paredes, animais que adentram as residências, presença de almofadas e bichos de pelúcia e, principalmente quanto às condições dos travesseiros, que deveriam estar limpos e com capa antialérgica.

O tempo médio em que os pacientes passam na sala foi de 5,8 horas, com um máximo de 8 horas e um mínimo de 3 horas; já no quarto, esse período é quase que o dobro, com uma média de 9,1 horas, com um máximo de 12 horas e um mínimo de 8 horas.

Tabela 3 – Distribuição da avaliação ambiental, em relação à adequação do controle ambiental do paciente alérgico, segundo o guia de avaliação ambiental do paciente alérgico. Botucatu, 2010.

<i>Avaliação ambiental</i>	<i>Quarto</i>		<i>Sala</i>	
	<i>Adequado</i> (%)	<i>Inadequado</i> (%)	<i>Adequado</i> (%)	<i>Inadequado</i> (%)
Carpete	100	-	100	0
Tapete	90	10	40	60
Cortina	60	40	60	0
Travesseiro	20	80	0	0
Colchão	50	50	0	0
Cobertor	50	50	0	0
Bicho pelúcia e almofada	60	40	30	70
Parede	80	20	80	20
Ambiente	60	40	60	40
Animal	40	60	50	50
Irritantes	70	30	40	60
Vasos	10	0	50	50
Móveis	70	30	20	80
Sofá	0	0	40	60

Os pacientes residiam em nove diferentes regiões da cidade de Botucatu sendo: uma no Jardim Rivieira, uma Jardim Itamaraty, uma Jardim Planalto, dois no

Bairro Monte Mor, uma no Parque da Cascatas, uma em Rubião Junior, um na Vila Aparecida, um na Vila Maria e um no Jardim Real.

4.2 – Aspectos relativos aos travesseiros

Os locais das moradias e das coletas dos travesseiros estão esquematizados na figura 1, conforme área de abrangência das unidades de saúde municipais, bem como os locais onde foram adquiridos os travesseiros que fizeram parte dos controles.

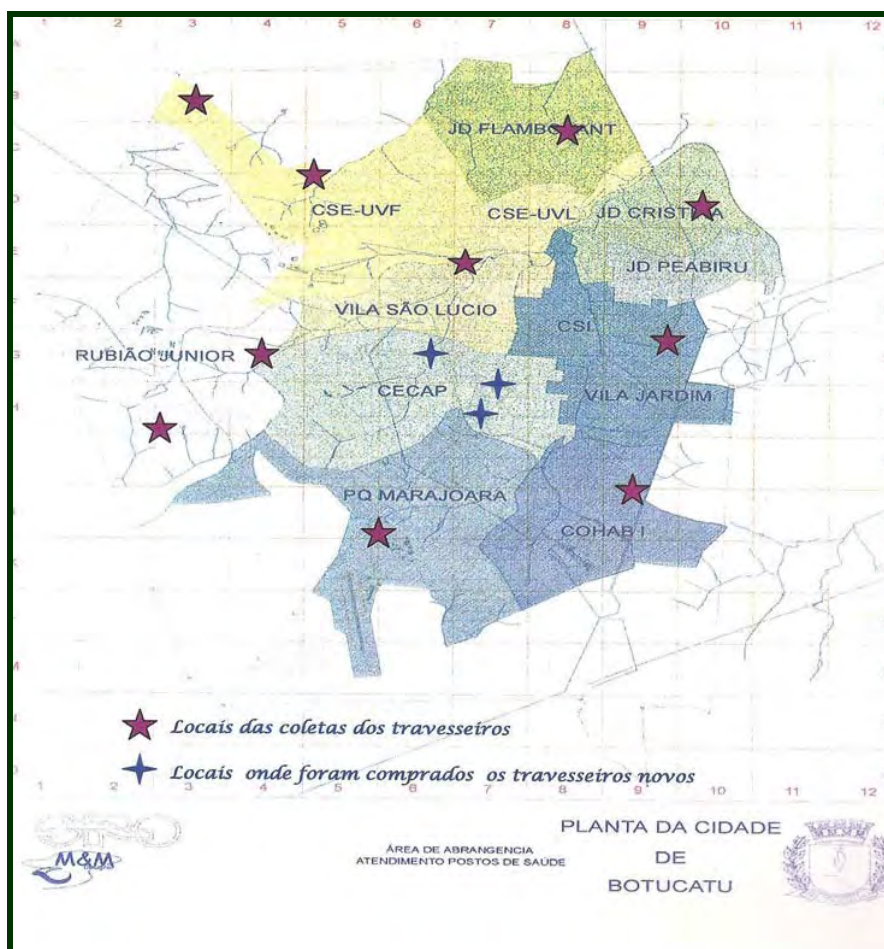


Figura 3 – Distribuição dos locais das coletas e das compras dos travesseiros. Botucatu, 2010.

Quanto às condições dos travesseiros, dois (20%) eram adequados, limpos e com capas apropriadas; dois (20%) não apresentavam capas e o enchimento apresentava-se com aspecto de sujo; três (30%) estavam com capa inadequada e sujeira aparente, sendo que dois deles com manchas de bolor, 3 (30%) com capas inadequadas

e com aspecto de limpo , já os controles todos tinham capa e nenhum deles apresentava sujeira aparente após serem abertos, como podemos observar nas figuras 4 e 5.



Figura 4 – Aspectos de alguns dos travesseiros dos pacientes. Botucatu, 2010.



Figura 5 – Aspectos dos travesseiros controle , segundo descrição do fabricante. Botucatu, 2010.

Tabela 4 – Distribuição dos travesseiros dos pacientes e dos controles, segundo tipo de enchimento. Botucatu, 2010.

<i>Tipo de enchimento</i>	<i>Paciente</i>	<i>Controle</i>
Espuma compacta	5	1
Espuma flocada	2	1
Manta acrílica	2	0
Pena	1	0
Viscoelástico	0	1
Total	10	3

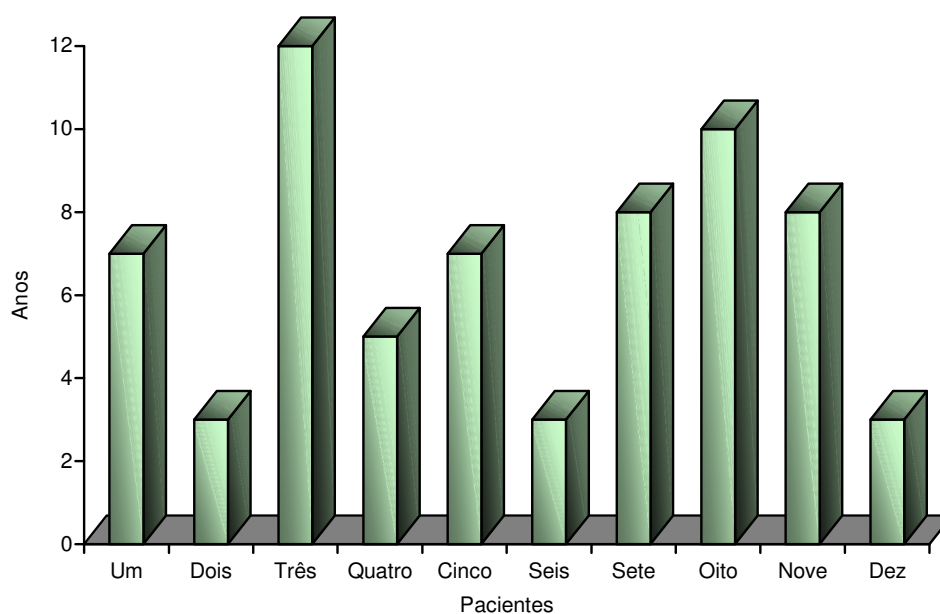


Figura 6 - Distribuição dos travesseiros dos pacientes, segundo tempo de uso em anos. Botucatu, 2010.

Em relação às condições microbiológicas dos travesseiros, todos estavam contaminados, tanto na sua área externa como na interna, inclusive os controles, sendo que em relação ao tempo de uso dos travesseiros, o número médio de UFC/m² de travesseiro, somente foi superior para aqueles que estavam em uso por mais de 7 anos,

tanto na sua área externa ($p=0,003$) quanto na sua área interna ($p=0,0018$), como podemos observar na tabela 5.

Tabela 5 - Estimativa da carga fúngica das áreas internas e externas, obtidas pelas médias UFC/m² dos travesseiros dos pacientes segundo meios de cultura e tempo de uso superior a 7 anos dos travesseiros. Botucatu, 2010.

<i>Tempo (Anos)</i>	<i>Área</i>	<i>Meios de cultura</i>	<i>Média</i>	<i>Mediana</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>p</i>
< = 7 anos	externo	SDA	808	970	526,37	0,026
		BDA	573	160	631,56	0,099
		DRBCA	240	230	171,32	0,142
		Total	540	453	443,08	0,002
	interno	SDA	666	150	766,31	0,045
		BDA	692	40	928,26	0,016
		DRBCA	394	72	219,31	0,001
		Total	584	87	637,96	0,018

SDA - Sabouraud Dextrose Agar , BDA - Batata Dextrose Agar , DRBCA - Dichoran Rose Bengala Choramphenicol Agar

Em relação à utilização dos três meios de cultura, a proporção de UFC/m² foi maior quando se utilizou o meio sabouraud dextrose agar, o qual se revelou superior ao batata dextrose Agar ($p = 0,003$) e ao dichoran rose bengala choramphenicol agar ($p=0 0,0005$) tanto para a área externa quanto para a interna ($p =0,003$), e mesmo quando comparado os travesseiros dos pacientes com os controles.

Tabela 6 – Distribuição das médias UFC/m² dos travesseiros dos pacientes e dos controles, segundo meios de cultura. Botucatu, 2010.

<i>Meios de cultura</i>	<i>Pacientes</i>		<i>Controle</i>		<i>P</i>
	<i>Externo</i> UFC/m ²	<i>Interno</i> UFC/m ²	<i>Externo</i> UFC/m ²	<i>Interno</i> UFC/m ²	
<i>SDA</i> (a)	621	379	140	93	a > c, a > b
<i>BDA</i> (b)	409	197	176	40	b = c, b < a
<i>DRBCA</i> (c)	441	228	163	27	b = c, c < a
Total	1471	804	479	160	

SDA - Sabouraud Dextrose Agar , BDA - Batata Dextrose Agar , DRBCA - Dichoran Rose Bengala Choramphenicol Agar .

A média de UFC/m² dos travesseiros dos pacientes, na sua parte externa foi de 1471,5, enquanto na sua parte interna de 803. Nos controles, a média de UFC/m² na sua parte externa foi de 480 e, na parte interna de 146,6, como podemos observar na tabela abaixo.

Tabela 7 – Medidas de dispersão e tendência central das médias das UFC/m² dos travesseiros dos pacientes e dos controles, segundo meios de cultura. Botucatu, 2010.

<i>Travesseiros</i>	<i>Área</i>	<i>Meio</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio</i>	<i>Mediana</i>	<i>25 %</i>	<i>75%</i>
<i>Pacientes</i>	<i>externo</i>	<i>SDA</i>	621	457,86	400	220	970
		<i>BDA</i>	416,50	489,60	155	110	740
		<i>DRBCA</i>	434	576,10	150	120	460
	<i>interno</i>	<i>SDA</i>	182	153,25	120	70	240
		<i>BDA</i>	242	365,86	87	70	168
		<i>DRBCA</i>	379	702,10	60	20	130
<i>Controle</i>	<i>externo</i>	<i>SDA</i>	140	75,5	150	60	210
		<i>BDA</i>	176,67	125,03	120	90	320
		<i>DRBCA</i>	163,33	46,19	190	110	190
	<i>interno</i>	<i>SDA</i>	93,3	30,55	100	60	120
		<i>BDA</i>	40,0	40,0	40,0	0	80
		<i>DRBCA</i>	26,67	23,09	40	0	40

SDA - Sabouraud Dextrose Agar , BDA - Batata Dextrose Agar , DRBCA - Dichoran Rose Bengala Choramphenicol Agar .

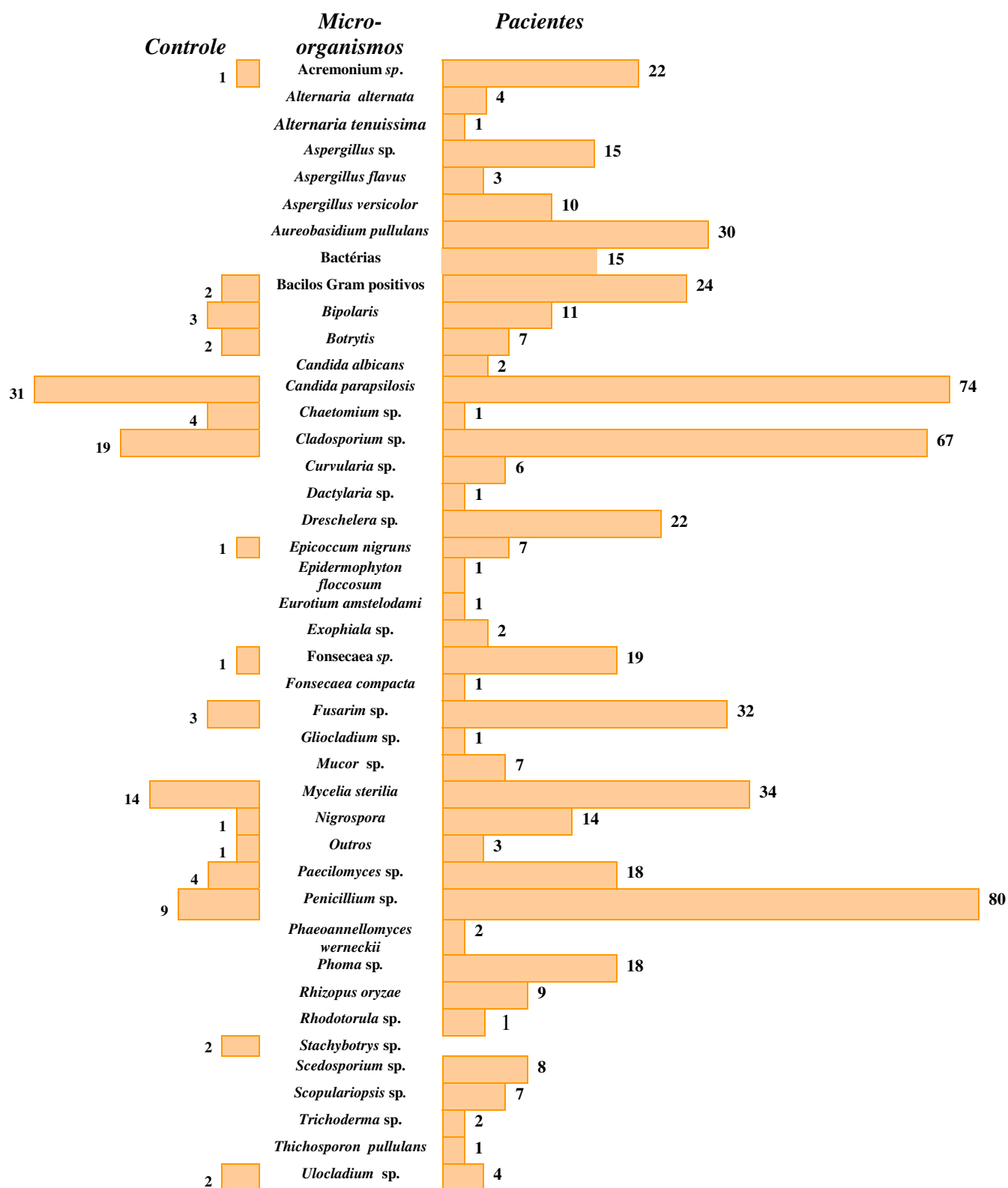
O modelo linear utilizado revelou uma tendência ($p = 0,05$) da maior ocorrência de UFC/m² na área externa e interna dos travesseiros dos pacientes quando comparado ao controle; porém a diversidade de micro-organismos encontrados nos travesseiros dos pacientes foi significativamente ($p < 0,003$) superior, tanto na área externa como na interna, quando comparado ao controle.

Em relação à diversidade de espécies fúngicas encontradas, detectou-se um número significativamente maior de espécies nos travesseiros dos pacientes, quando comparados com os travesseiros controle, com 42 e 17 tipos, respectivamente de um total de 587 (85,4%) e 100 (14,5%) isolados micro-organismos obtidos (tabela 8 e na figura 7).

Tabela 8 – Distribuição percentual dos micro-organismos encontrados nos travesseiros dos pacientes e dos controles. Botucatu, 2010.

<i>Microorganismo</i> <i>Travesseiros</i>	<i>Paciente</i>		<i>Controle</i>		<i>Total</i>	
	N	%	N	%	N	%
<i>Acremonium</i> sp.	22	3,2	1	0,2	23	3,5
<i>Alternaria alternata</i>	4	0,7	0	0	4	0,7
<i>Alternaria tenuissima</i>	1	0,2	0	0	1	0,2
<i>Aspergillus</i> sp.	15	2,2	0	0	15	2,2
<i>Aspergillus flavus</i>	3	0,4	0	0	3	0,4
<i>Aspergillus versicolor</i>	10	1,5	0	0	10	1,5
<i>Aureobasidium pullulans</i>	30	4,4	0	0	30	4,4
Bactérias	15	2,2	0	0	15	2,2
Bacilos Gram positivos	24	3,5	2	0,3	26	3,8
<i>Bipolaris</i>	11	1,6	3	0,4	14	2,1
<i>Botrytis</i>	7	1,0	2	0,3	9	1,3
<i>Candida albicans</i>	2	0,3	0	0	2	0,3
<i>Candida parapsilosis</i>	74	10,8	31	4,5	105	15,3
<i>Chaetomium</i> sp.	1	0,2	4	0,6	5	0,8
<i>Cladosporium</i> sp.	67	9,7	19	2,8	86	12,5
<i>Curvularia</i> sp.	6	0,9	0	0	6	0,9
<i>Dactylaria</i> sp.	1	0,2	0	0	1	0,2
<i>Dreschlera</i> sp.	22	3,2	0	0	22	3,2
<i>Epicoccum nigrans</i>	7	1,0	1	0,2	8	1,2
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1	0,2	0	0	1	0,2
<i>Eurotium amstelodami</i>	1	0,2	0	0	1	0,2
<i>Exophiala</i> sp.	2	0,3	0	0	2	0,3
<i>Fonsecaea</i> sp.	19	2,8	1	0,2	20	2,9
<i>Fonsecaea compacta</i>	1	0,2	0	0	1	0,2
<i>Fusarium</i> sp.	32	4,7	3	0,4	35	5,1
<i>Gliocladium</i> sp.	1	0,2	0	0	1	0,2
<i>Mucor</i> sp.	7	1,0	0	0	7	1,0
<i>Mycelia sterilia</i>	34	4,9	14	2,0	48	7,0
<i>Nigrospora</i>	14	2,0	1	0,2	15	2,2
<i>Outros</i>	3	0,4	1	0,2	4	0,6
<i>Paecilomyces</i> sp.	18	2,6	4	0,6	22	3,2
<i>Penicillium</i> sp.	80	11,6	9	1,3	89	12,9
<i>Phaeoannellomyces werneckii</i>	2	0,3	0	0	2	0,3
<i>Phoma</i> sp.	18	2,6	0	0	18	2,6
<i>Rhizopus oryzae</i>	9	1,3	0	0	9	1,3
<i>Rhodotorula</i> sp.	1	0,2	0	0	1	0,2
<i>Stachybotrys</i> sp.	0	0	2	0,3	2	0,3
<i>Scedosporium</i> sp.	8	1,2	0	0	8	1,2
<i>Scopulariopsis</i> sp.	7	1,1	0	0	7	1,0
<i>Trichoderma</i> sp.	2	0,3	0	0	2	0,3
<i>Thichosporon pullulans</i>	1	0,2	0	0	1	0,2
<i>Ulocladium</i> sp.	4	0,6	2	0,3	6	0,9
Total	587	85,4	100	14,6	687	100

A taxonomia esta de acordo com NCBI Taxonomy Browser ([HTTP:// WWW.ncbi.nih.gov/taxonomy/browser](http://WWW.ncbi.nih.gov/taxonomy/browser))



A taxônomia está de acordo com NCBI Taxonomy Browser ([HTTP:// WWW.ncbi.nih.gov/taxonomy/browser](http://WWW.ncbi.nih.gov/taxonomy/browser))

Figura 7- Distribuição das frequências dos micro-organismos encontrados nos travesseiros dos pacientes e nos controles. Botucatu, 2010.

Em relação aos fungos mais frequentemente encontrados nos controles, e sua ocorrência percentual nos travesseiros dos pacientes, podemos observar na figura 8 , que a *Candida parapsilosis* foi encontrada em 31% dos controles contra 12,6% dos pacientes , seguida de *Cladosporim sp.* 19% contra 11,4% , *Mycelia sterilia* 14% contra 5,8% e *Penicillium sp.* 9% contra 13,7% .

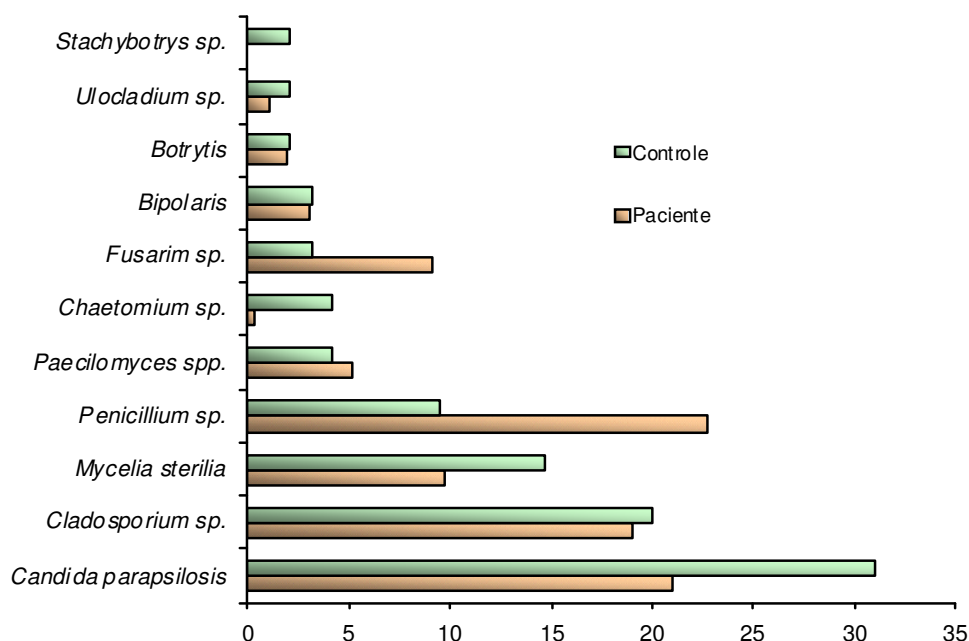


Figura 8 - Distribuição percentual dos 11 fungos mais frequentes encontrados nos controles, e sua ocorrência percentual nos travesseiros dos pacientes . Botucatu, 2010.

Em relação aos fungos, frequentemente encontrados nos travesseiros dos pacientes, e sua ocorrência percentual nos travesseiros controle, os micro-organismos e os seus respectivos percentuais encontrados foram: 13,6 % *Penicillium sp.*, 12,6%, *Cândida parapsilosis* ,11,4%, *Cladosporium sp.* 5,7% *Mycelia sterilia*, 5,5% *Fusarium sp.*, 5,1% *Aureobasidium pullulans*, 3,8% *Dreschelera sp.*, 3,8% *Acremonium sp.* ,3,2% *Fonsecae sp.*, 3,1% *Paecilomyces sp.*, 3,1% *Phoma sp.* , 2,6% *Aspergillus sp.* e 2,3% *Nigrospora sp.*. Em contrapartida, não foram encontrados nos controles: *Phoma sp.*, *Aureobasidium pullulans*, *Dreschelera sp.*, *Aspergillus sp.* e , exceto *Fusarium sp.*, Bacilos gram negativos, *Acremonium sp.*, *Fonsecae sp.*,e *Nigrospora sp.*, todos os demais foram encontrados em percentual bastante superior, como podemos observar na figura abaixo

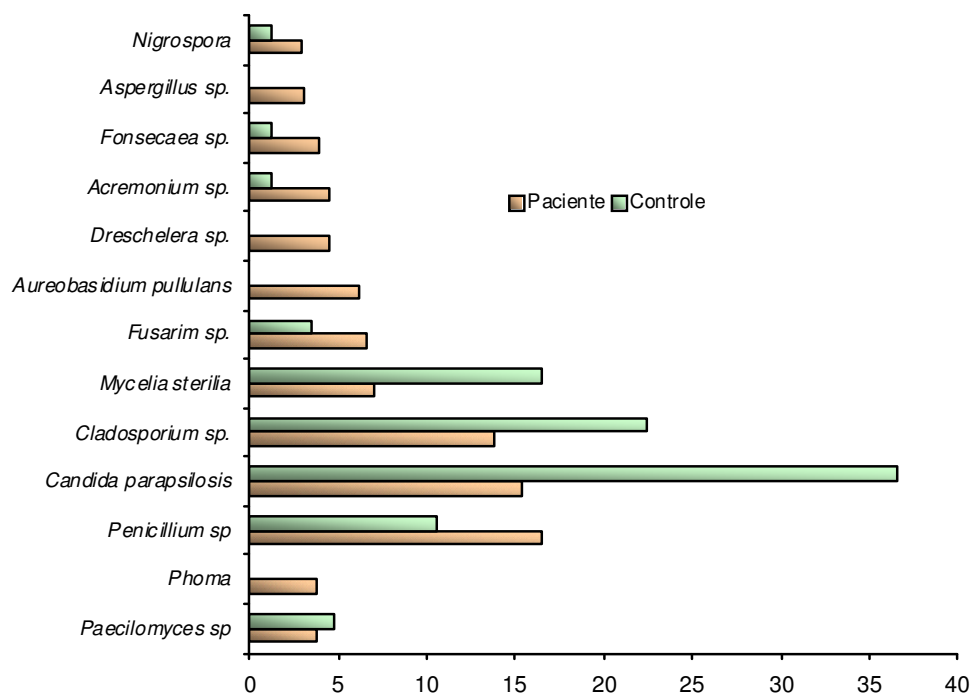
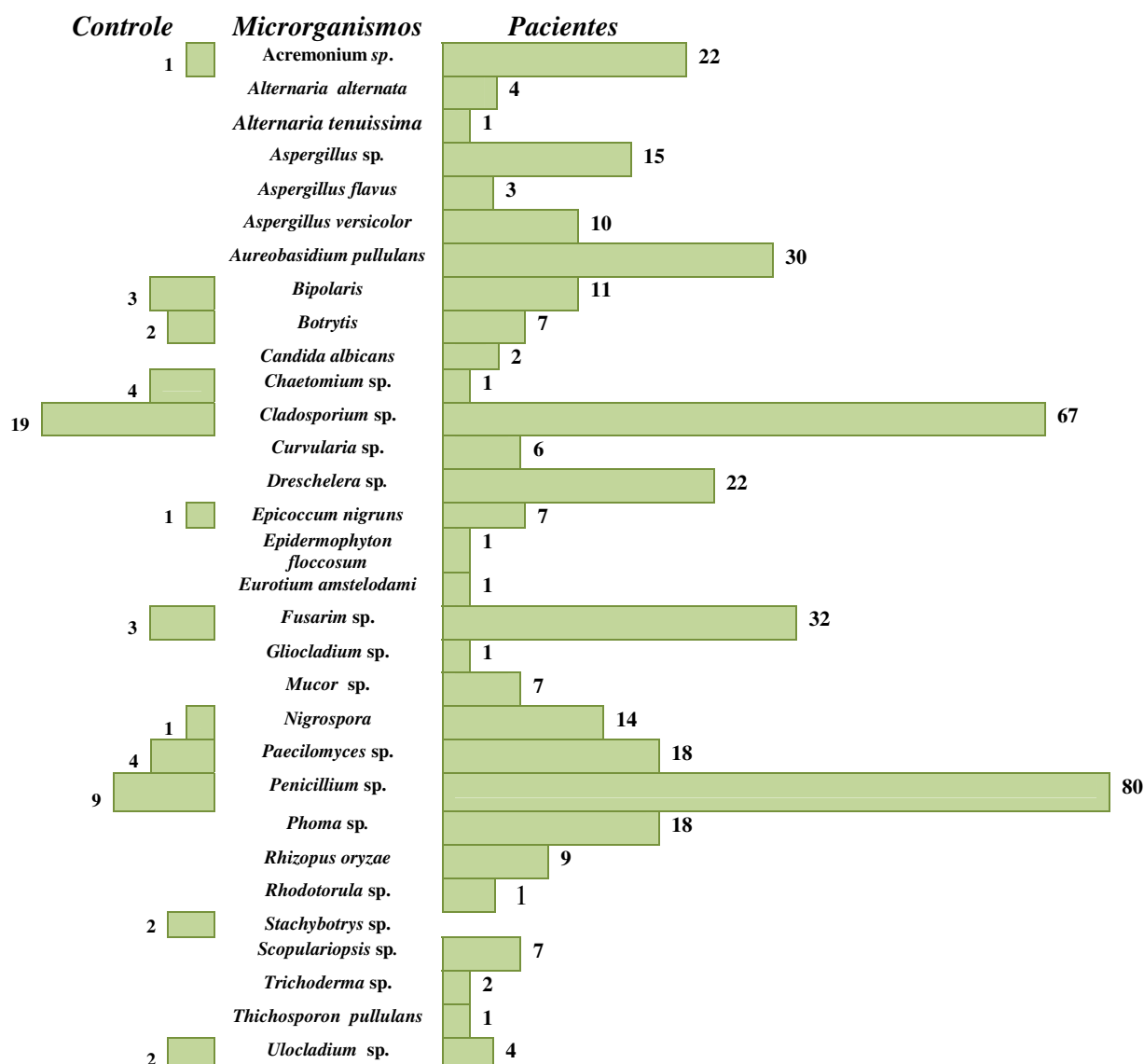


Figura 9 - Distribuição percentual dos 13 fungos mais frequentes encontrados nos travesseiros dos pacientes, e sua ocorrência percentual nos travesseiros controle. Botucatu, 2010.

Dos 42 espécies e, ou, outro nível taxonômico identificados , 31 (73,8%) podem causar alergia do Tipo I – IgE mediada, segundo dados disponíveis na literatura atual , como podemos observar na figura 10 , sendo que a *Mycelia sterilia* , apesar de ter sido excluída desta relação, é considerada alergênica com relação não estabelecida. Porém, todos aqueles micro-organismos que foram excluídos são patógenos importantes de diversos tipos de doenças.



A taxonomia está de acordo com NCBI Taxonomy Browser ([HTTP:// WWW.ncbi.nih.gov/taxonomy/browser](http://WWW.ncbi.nih.gov/taxonomy/browser))

Figura 10 - Distribuição das frequências dos fungos encontrados nos travesseiros dos pacientes e nos controles que podem causar alergia do Tipo I – IgE mediada, segundo dados disponíveis na literatura⁹⁰. Botucatu, 2010

Apesar de o meio de cultura sabouraud dextrose agar ter sido considerado estatisticamente superior aos demais meios, se tivéssemos utilizado somente este meio muitos micro-organismos não teriam sido identificados, como podemos observar nas tabelas 8 e 9.

Na tabela 9, podemos observar que 66% dos micro-organismos foram identificados na parte externa dos travesseiros, sendo 35,4% no meio SDA , 35,7%

BDA e 28,9% DRBCA, enquanto na parte interna foram identificados 34,0% dos micro-organismos, sendo 42% no meio SDA, 34,0% BDA e 20,0% no meio DRBCA.

Importante observarmos que, mesmo aspirando a mesma área, muitos micro-organismos não foram identificados em todos os meios. Uma variedade e uma quantidade maior de micro-organismos foram encontradas na área externa, e os grupos que cresceram com maior frequência neste local foram: *Penicillium* sp. (13,4%), *Cândida parapsilosis* (12,7%), *Cladosporium* sp. (9,8%), *Mycelia sterilia* (7,8%) e *Fonsecaea* sp. (4,1%); na parte interna foram: *Cladosporium* sp. (14,5%), *Penicillium* sp. (14,0%), *Cândida parapsilosis* (12,5%), *Fusarium* sp. (10,0%) e *Aureobasidium pullulans* (7,0%) .

Assim, foram identificados 40 tipos diferentes de fungos, porém, ao realizarmos os testes alérgicos e utilizarmos bateria para fungos II, como vimos na tabela 1, estamos somente testando 15% dos fungos encontrados nos travesseiros, o que corresponde a: *Cladosporium* sp. 11,8%, *Aspergillus* sp. 4,35%, *Penicillium* sp. 13,8%, *Rhizopus* 1,4% e *Rhodotorula* sp. 16%.

Tabela 9 – Distribuição percentual dos microrganismos encontrados na área externa e interna dos travesseiros dos pacientes, segundo meios de cultura utilizados. Botucatu, 2010.

<i>Micro-organismo meios de cultura</i>	Externo				Interno			
	<i>SDA</i>	<i>BDA</i>	<i>DRBCA</i>	<i>Total</i>	<i>SDA</i>	<i>BDA</i>	<i>DRBCA</i>	<i>Total</i>
<i>Acremonium</i> sp.	3	7	2	12	5	4	1	10
<i>Alternaria alternata</i>	1	0	0	1	0	2	1	3
<i>Alternaria tenuissima</i>	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Aspergillus</i> sp.	7	1	5	13	0	2	0	2
<i>Aspergillus flavus</i>	2	0	0	2	0	1	0	1
<i>Aspergillus versicolor</i>	4	2	0	6	1	0	3	4
<i>Aureobasidium pullulans</i>	2	3	11	16	8	2	4	14
Bactérias	5	2	2	9	2	3	1	6
Bacilos Gram positivos	4	9	0	13	6	5	0	11
<i>Bipolaris</i>	2	2	3	7	3	1	0	4
<i>Botrytis</i>	0	0	6	6	0	0	1	1
<i>Candida albicans</i>	1	1	0	2	0	0	0	0
<i>Candida parapsilosis</i>	24	14	11	49	8	8	9	25
<i>Chaetomium</i> sp.	1	0	0	1	0	0	0	0
<i>Cladosporium</i> sp.	12	20	6	38	7	12	10	29
<i>Curvularia</i> sp.	1	2	0	3	1	1	1	3
<i>Dactylaria</i> sp.	0	0	1	1	0	0	0	0
<i>Dreschlera</i> sp.	5	5	7	17	3	2	0	5
<i>Epicoecum nigrans</i>	3	1	2	6	0	0	1	1
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1	0	0	1	0	0	0	0
<i>Eurotium amstelodami</i>	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Exophiala</i> sp.	0	0	1	1	1	0	0	1
<i>Fonsecaea</i> sp.	8	6	3	17	1	0	1	2
<i>Fonsecaea compacta</i>	0	1	0	1	0	0	0	0
<i>Fusarium</i> sp.	0	9	3	12	10	7	3	20
<i>Gliocladium</i> sp.	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Mucor</i> sp.	1	5	0	6	1	0	0	1
<i>Mycelia sterilia</i>	11	10	9	30	2	1	1	4
<i>Nigrospora</i>	3	5	4	12	2	0	0	2
Outros	2	1	0	3	0	0	0	0
<i>Paecilomyces</i> sp.	6	2	3	11	4	2	1	7
<i>Penicillium</i> sp.	22	18	12	52	13	9	6	28
<i>Phaeoannellomyces werneckii</i>	1	0	0	1	0	1	0	1
<i>Phoma</i> sp.	0	4	10	14	1	1	2	4
<i>Rhizopus oryzae</i>	2	1	3	6	2	0	1	3
<i>Rhodotorula</i> sp.	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Stachybotrys</i> sp.	0	1	0	1	0	0	0	0
<i>Scedosporium</i> sp.	1	4	2	7	0	1	0	1
<i>Scopulariopsis</i> sp.	1	1	2	4	1	2	0	3
<i>Trichoderma</i> sp.	0	1	1	2	0	0	0	0
<i>Thichosporon pullulans</i>	1	0	0	1	0	0	0	0
<i>Ulocladium</i> sp.	0	0	3	3	1	0	1	2
Total	137	138	112	387	84	68	40	200

SDA - Sabouraud Dextrose Agar , BDA - Batata Dextrose Agar , DRBCA - Dichoran Rose Bengala Choramphenicol Agar .

Na tabela 10, podemos observar que 72% dos micro-organismos foram detectados e identificados na parte externa dos controles, sendo 36,1% no SDA , 34,7% BDA e 29,2% DRBCA. Na parte interna, foram identificados 28,0% dos micro-organismos, sendo 39,3% SDA, 32,1% BDA e 28,6% DRBCA.

O mesmo fato ocorreu como nos travesseiros dos pacientes, onde pudemos observar que, mesmo aspirando a mesma área, muitos micro-organismos não foram identificados em todos os meios. Uma variedade e uma quantidade maior de micro-organismos foram encontradas na parte externa, os que cresceram com maior frequência na parte externa foram : *Candida parapsilosis* (22,2%), *Cladosporium* sp. (16,7%), *Mycelia sterilia* (16,7%) , *Penicillium* sp.(12,5%); na parte interna, foram identificados 9 grupos de fungos sendo os mais frequentes: *Candida parapsilosis* (42,9%), *Cladosporium* sp. (25,0%), *Penicillium* sp.(14,0%).

Tabela 10 – Distribuição percentual dos micro-organismos encontrados na área externa e interna dos travesseiros controle, segundo meios de cultura utilizados. Botucatu, 2010.

<i>Micro-organismo</i> <i>Meio de cultura</i>	Externo				Interno			
	<i>SDA</i>	<i>BDA</i>	<i>DRBCA</i>	<i>Total</i>	<i>SDA</i>	<i>BDA</i>	<i>DRBCA</i>	<i>Total</i>
	%	%	%	%	%	%	%	%
<i>Acremonium</i> sp.	0	0	0	0	0	1	0	1
Bacilos G positivos	2	0	0	2	0	0	0	0
<i>Bipolaris</i>	0	2	0	2	0	1	0	1
<i>Botrytis</i>	1	0	0	1	1	0	0	1
<i>Candida parapsilosis</i>	8	4	8	16	4	3	4	12
<i>Chaetomium</i> sp.	0	3	1	4	0	0	0	0
<i>Cladosporium</i> sp,	3	3	6	12	3	1	3	7
<i>Epicoccum nigrans</i>	1	0	0	1	0	0	0	0
<i>Fonsecaea</i> sp.	0	1	0	1	0	0	0	0
<i>Fusarium</i> sp.	1	0	0	1	0	2	0	2
<i>Mycelia sterilia</i>	4	5	3	12	1	1	0	2
<i>Nigrospora</i>	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Outros</i>	1	0	0	1	0	0	0	0
<i>Paecilomyces</i> sp.	2	1	1	4	0	0	0	0
<i>Penicillium</i> sp.	3	5	1	9	0	0	0	0
<i>Stachybotrys</i> sp.	0	1	1	2	0	0	0	0
<i>Ulocladium</i> sp.	0	0	0	0	1	0	1	2
Total	26	25	21	72	11	9	8	28

SDA - Sabouraud Dextrose Agar , BDA - Batata Dextrose Agar , DRBCA - Dichoran Rose Bengala Choramphenicol Agar

Tabela 11 - Distribuição dos micro-organismos encontrados na área externa e interna nos transeiros dos pacientes, segundo tipo de enchimento. Botucatu, 2010

Micro-organismo Tipo de enchimento	Externo				Interno			
	ED N=5	EF N=2	MA N=2	P N=1	ED N=5	EF N=2	MA N=2	P N=1
<i>Acremonium</i> sp.	7	1	4	1	1	5	3	0
<i>Alternaria alternata</i>	1	0	0	0	0	0	0	3
<i>Alternaria tenuissima</i>	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Aspergillus</i> SP.	7	4	0	1	0	0	2	1
<i>Aspergillus flavus</i>	0	1	1	0	1	0	0	0
<i>Aspergillus versicolor</i>	3	1	0	3	2	1	0	0
<i>Aureobasidium pullulans</i>	8	0	4	4	1	8	5	0
Bactérias	6	3	0	0	3	1	0	2
Bacilos Gram positivos	1	7	6	0	1	7	2	0
<i>Bipolaris</i>	5	0	2	0	2	0	2	0
<i>Botrytis</i>	1	5	0	0	0	1	0	0
<i>Candida albicans</i>	0	0	2	0	0	0	0	0
<i>Candida parapsilosis</i>	24	6	16	3	9	6	3	7
<i>Chaetomium</i> sp.	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Cladosporium</i> sp.	19	9	10	0	16	4	9	0
<i>Curvularia</i> sp.	1	1	0	1	1	2	0	0
<i>Dactylaria</i> sp.	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dreschelera</i> sp.	2	3	0	1	0	0	0	1
<i>Epicoccum nigrans</i>	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Epidermophyton floccosum</i>	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Eurotium amstelodami</i>	1	0	0	0	1	0	0	0
<i>Exophiala</i> sp.	9	0	7	1	1	0	0	1
<i>Fonsecaea</i> sp.	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Fonsecaea compacta</i>	2	3	0	1	0	0	0	1
<i>Fusarium</i> sp.	6	6	3	0	6	5	5	1
<i>Gliocladium</i> sp.	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Mucor</i> sp.	6	0	0	0	1	0	0	0
<i>Mycelia sterilia</i>	17	7	5	0	2	2	1	0
<i>Nigrospora</i>	4	0	8	0	0	0	2	0
Outros	3	0	0	0	0	0	0	0
<i>Paecilomyces</i> sp.	6	2	1	2	6	0	1	0
<i>Penicillium</i> sp.	27	5	9	11	4	15	3	6
<i>Phaeoellomyces werneckii</i>	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>Phoma</i> sp.	0	12	0	2	3	1	0	0
<i>Rhizopus oryzae</i>	2	4	0	0	2	1	0	0
<i>Rhodotorula</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Stachybotrys</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Scedosporium</i> sp.	0	3	2	2	0	1	0	0
<i>Scopulariopsis</i> sp.	3	0	0	1	0	2	0	1
<i>Trichoderma</i> sp.	0	2	0	0	0	0	0	0
<i>Thichosporon pullulans</i>	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Ulocladium</i> sp.	2	0	1	0	1	0	0	0
Total	185	83	86	36	70	63	39	25

ED= espuma densa, EF = espuma flocos, MA= manta acrílica, P = pena.

Em relação ao tipo de enchimento dos travesseiros, foram identificados na área externa dos travesseiros dos pacientes de espuma densa 185 (47,4%) micro-organismos pertencentes a 29 *taxa* diferentes, incluindo os identificados até nível de espécie ou de gênero , e no caso de bactérias , o grupo ; nos de espuma de flocos 83 (21,2%) micro-organismos com 20 tipos taxonômicos, nos de manta acrílica 86 (22,1%) micro-organismos com 19 diferentes tipos taxonômicos e no de pena 36 (9,2%) micro-organismos com 14 tipos diferentes .Já na área interna com enchimento de espuma densa, foram identificados 70 (35,5%) micro-organismos, sendo 21 *taxa* diferentes; nos de espuma de flocos 63 (32,0%) micro-organismos com 17 *taxa* diferentes nos de manta acrílica 39 (19,8%) micro-organismos com 13 tipos taxonômicos e no de pena 25 (12,7%) micro-organismos com 14 *taxa* .

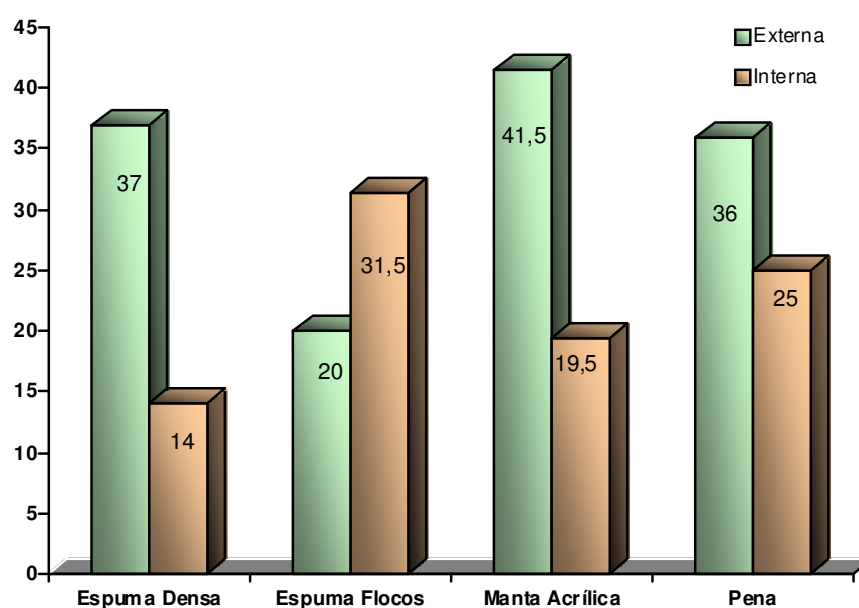


Figura 11 - Distribuição do número médio dos micro-organismos encontrados nos travesseiros dos pacientes, segundo área externa e área interna. Botucatu, 2010.

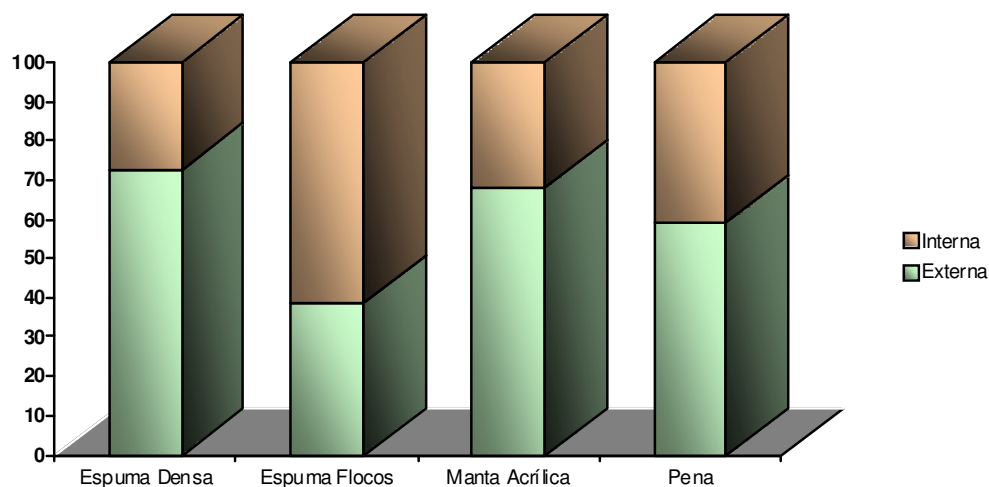


Figura 12 – Distribuição percentual do número médio dos micro-organismos encontrados nos travesseiros dos pacientes, segunda área avaliada: externa e interna. Botucatu, 2010.

Nas figuras 11 e 12, podemos observar que a distribuição, segundo área, depende do material do enchimento e que não existiu um travesseiro ideal em que não houvesse crescimento de micro-organismos ou que esse crescimento se desse exclusivamente na parte externa o que permitiria uma limpeza mais fácil, ou a substituição das capas.

Se analisarmos o tipo de enchimento e as condições dos travesseiros, os de espuma em flocos eram os que tinham as piores condições, seguido dos de manta acrílica que não apresentavam capas e o enchimento apresentava-se com aspecto de sujo.

Na tabela 12, o número de micro-organismos encontrados na parte externa dos travesseiros controle permite constataremos que no de espuma densa foram identificados 23 (31,9%) micro-organismos, sendo 6 *taxa* diferentes; no de espuma de flocos 33 (45,8%) micro-organismos com 8 diferentes espécies, e no de viscoelástico 16 (22,2%) micro-organismos com 8 espécies diferentes. Na parte interna, constatamos que no de espuma densa foram identificadas 18 (64,3%) micro-organismos, sendo 7 *taxa* diferentes; no de espuma de flocos 9 (32,1%) micro-organismos com 3 diferentes espécies, e no de viscoelástico 1 (3,6%) micro-organismos com 1 espécie diferente. É importante lembrar que todos eles, segundo o fabricante eram antiácaros, anti-mofo e antialérgicos.

Tabela 12 - Distribuição dos micro-organismos encontrados na parte externa e na parte interna nos travessieiros controles , segundo tipo de enchimento. Botucatu, 2010

<i>Micro-organismo</i>	<i>Tipo de enchimento</i>	<i>Externo</i>			<i>Interno</i>		
		<i>ED</i>	<i>EF</i>	<i>V</i>	<i>ED</i>	<i>EF</i>	<i>V</i>
<i>Acremonium</i> sp.		0	0	0	1	0	0
Bacilos Gram positivos		0	2	0	0	0	0
<i>Bipolaris</i>		0	0	2	1	0	0
<i>Botrytis</i>		0	0	1	1	0	0
<i>Candida parapsilosis</i>		6	10	4	6	5	0
<i>Chaetomium</i> sp.		4	0	0	0	0	0
<i>Cladosporium</i> sp.		3	5	3	6	2	0
<i>Epicoccum nigrans</i>		1	0	0	0	0	0
<i>Fonsecaea</i> sp.		1	0	0	0	0	0
<i>Fusarium</i> sp.		0	0	1	2	0	0
<i>Mycelia sterilia</i>		8	2	3	1	0	0
<i>Nigrospora</i>		0	1	0	0	0	0
<i>Outros</i>		0	1	0	0	0	0
<i>Paecilomyces</i> sp.		0	3	1	0	0	0
<i>Penicillium</i> sp.		0	9	0	0	0	0
<i>Stachybotrys</i> sp.		0	0	1	0	0	1
<i>Ulocladium</i> sp.		0	0	0	0	2	0
Total		23	33	16	18	9	1

ED= espuma densa, EF = espuma flocos, V = Viscoelástico (NASA).

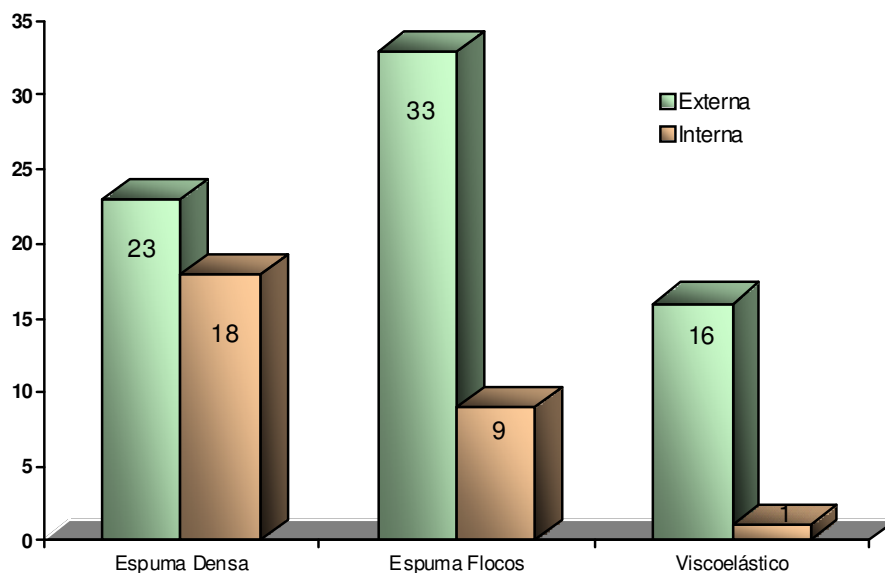


Figura 13 - Distribuição do número médio dos micro-organismos encontrados nos travessieiros dos pacientes na área externa e interna. Botucatu, 2010.

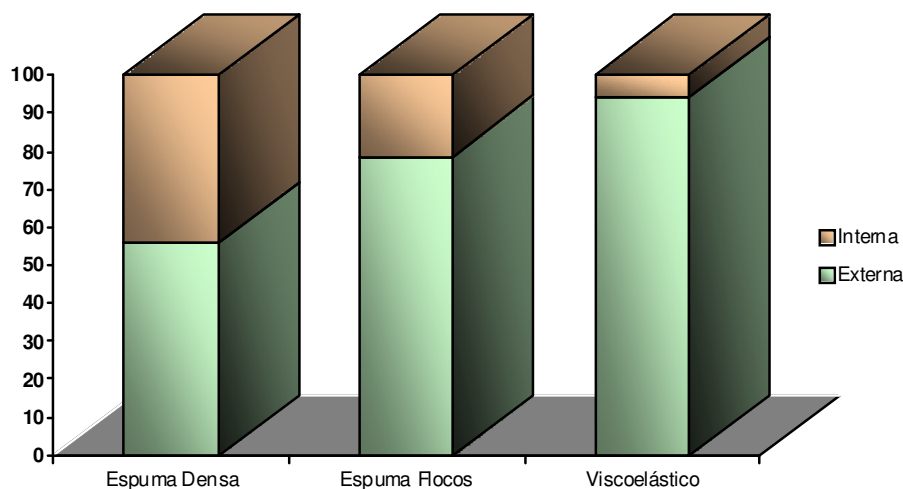


Figura 14 – Distribuição percentual do número médio dos micro-organismos encontrados nos travesseiros controle, segunda área avaliada: externa e interna. Botucatu, 2010.

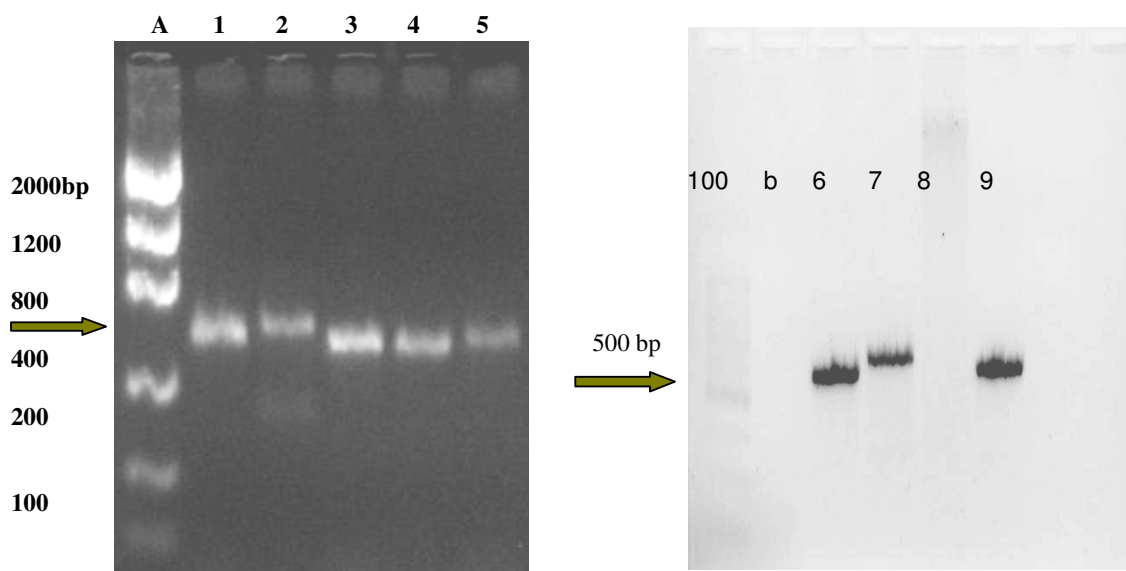
Pode-se observar que dos três travesseiros avaliados, segundo seu enchimento, o de viscoelástico mostrou-se com menor crescimento de micro-organismos em ambas as áreas; este teve menor crescimento interno quer em valores absolutos ou relativos quando comparado aos demais, como podemos observar nas figuras 13 e 14.

Em relação aos travesseiros dos pacientes, o número médio de micro-organismos foi maior que no controle e, no com enchimento com espuma densa, o resultado foi maior em comparação com os demais travesseiros controle. Já nos com enchimento de espuma em flocos, na parte externa houve isolamento de maior número de micro-organismos se comparado ao controle com esse mesmo enchimento. Há que se questionar se o uso, pelo paciente favorece a alteração nas proporções de micro-organismos identificados, segundo área externa e interna.

4.3- Identificação molecular.

A identificação molecular, realizada pela amplificação e sequenciamento da região de ITS-5.8S rDNA, foi efetuada para oito isolados fúngicos selecionados, quer seja para a confirmação da identificação micológica (métodos tradicionais) previamente realizada em espécies consideradas representativas ou mais frequentes, como para a resolução de alguns isolados que apresentaram maiores dificuldades de identificação pelos procedimentos tradicionais. Oito isolados foram então processados quanto à extração de DNA e amplificação com os primers ITS4/ITS5. O tamanho dos fragmentos

obtidos foi de cerca de 600 pb (Figura 15), os quais foram purificados e encaminhados para o seqüenciamento. As sequências gênicas obtidas foram então comparadas pela ferramenta Blastn, junto às bases de dados (Genbank e outros), e a identidade taxonômica obtida tomando como base os alinhamentos com maior identidade e baixos valores de *E-value*. As taxa obtidos pela identificação molecular estão listados na Tabela 13, juntamente com os respectivos códigos de acessos da sequência com maior identidade depositada no Genbank. Observa-se que foi possível a identificação em nível de espécie para 07 isolados e em nível apenas de gênero para 02 isolados. Os aspectos microscópicos destas mesmas espécies estão representados na Figura 16. O método molecular foi mais eficiente para a identificação, pois confirmou a identidade de algumas espécies, previamente reconhecidas apenas em nível de gênero, exceto em um isolado o qual havia sido inicialmente identificado com *Penicillium* sp. pelo método micológico tradicional e que mostrou ser *Paecilomyces* spp.



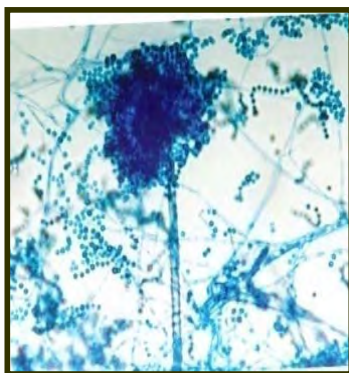
a- Low mass ; b – NO ; 1- *Aspergillus versicolor*, 2 - *Rhizopus oryzae*, 3- *Alternaria tenuissima*; 4- *Eurotium amstelodami*; 5- *Penicillium* sp.; 6- *Paecilomyces* spp.; 7 - *Rhodotorula mucilaginosa* ; 9 - *Alternaria alternata*.

Figura 15 - Distribuição dos tamanhos dos DNA amplificados, segundo pares de bases dos fungos. Botucatu, 2010

Quadro 1- Distribuição das cepas dos fungos incluídas neste estudo e a suas sequências de rDNA submetidas ao GenBank e suas respectivas referências. Botucatu, 2010.

Gel Número	Fungos	*Acesso GenBank Número	Referências*
1	<i>Aspergillus versicolor</i>	FJ878627.1	Arabatzis M, Velegraki A ⁹¹
2	<i>Rhizopus oryzae</i>	AB 381938.1	Kitpreechavanich et al. ⁹²
3	<i>Alternaria tenuissima</i>	FJ878627.1	Li, S , Yu L. ⁹³
4	<i>Eurotium amstelodami</i>	EU 551200.1	Peterson RA, et al ⁹⁴
5	<i>Penicilium</i> sp.	FJ 872070.1	Lygis V,et al . ⁹⁵
6	<i>Paecilomyces</i> spp.	AY753328	Castelli MV et al. ⁹⁶
7	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	AY547285	Chou H et AL ⁹⁷
9	<i>Alternaria alternata</i>	V82633	De Vouge MW et al. ⁹⁸

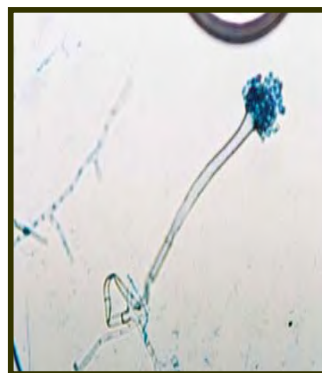
* Obtida do banco de dados GenBank , acesso <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>



Aspergillus versicolor



Rhizopus oryzae



Eurotium amstelodami



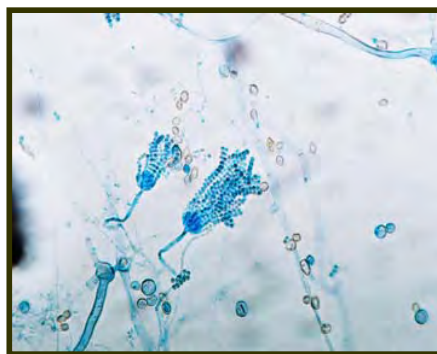
Alternaria tenuissima



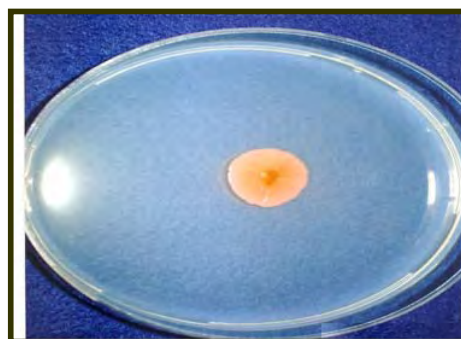
Alternaria alternata



Penicillium sp.



Paecilomyces spp.



Rhodotorula mucilaginosa

Figura 16- Fotos dos fungos incluídas neste estudo e que foram sequenciados no Centro do Estudo do Genoma Humano - USP.Botucatu, 2010.

Em relação à análise de DNA que foi realizada para algumas espécies, estas o foram pela dificuldade em caracterizar alguns fungos que ao microcultivo se apresentaram muito diferentes entre os gêneros identificados e em um caso pela dificuldade de avaliação. Todas as cepas de fungos enviadas para o sequenciamento foram confirmadas quanto ao gênero, exceto em relação ao *Paecilomyces* spp. Em relação à espécie, estes se revelaram diferentes dos que identificamos, com exceção *Penicilium* sp., *Rhodotorula mucilaginosa* e *Alternaria alternata*.

5.0 - DISCUSSÃO

As pesquisas relacionadas ao reconhecimento das causas do aumento das doenças alérgicas têm sido focadas na identificação dos genes responsáveis pela atopia, nos fatores de risco potenciais encontrados no ambiente e nos possíveis fatores de proteção que poderiam se contrapor ao desenvolvimento destas doenças. Com as modificações ambientais, ocorridas nas últimas décadas, muitos fatores deixaram de ser importantes e outros se tornaram mais evidentes, assim, as doenças alérgicas podem ser consideradas resultados da interação entre a exposição, a falta de proteção e as características genéticas de um indivíduo suscetível. Mais de 80 gêneros de fungos já foram identificados como causadores de alergias com reação do tipo I- mediada por IgE, em pessoas sensíveis, enquanto proteínas alergênicas foram identificadas em 23 gêneros de fungos⁵⁰.

Em estudo realizado na França, foi observado que proteínas oriundas de diversos gêneros de fungos, presentes nos domicílios de asmáticos, eram responsáveis por 14,6% de sensibilização dos indivíduos, precedida pelos ácaros da poeira doméstica e de epitélios de animais, evidenciando assim a importância dos fungos na patogênese das doenças alérgicas²⁸.

No Brasil, a frequência de testes positivos para fungos varia de 2,2% a 33%, e no presente estudo foi de 5,5% , diferentemente do encontrado por Croce et al.¹⁷ no ano de 2003, nesta mesma cidade, mas em outro serviço, que foi de 57% . Outro estudo para avaliar hipersensibilidade ao mofo, realizado no Estado de São Paulo⁵², demonstrou baixa frequência de positividade aos testes alérgicos para fungos, utilizando extratos de *Aspergillus* sp. , *Cladosporium* sp. , *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. e *Mucor* sp. , em pacientes com asma e, ou, rinite, apesar de nos pacientes com asma os índices terem sido discretamente mais elevados (7,3%) do que nos pacientes com rinite isolada (5,8%). Essa baixa positividade encontrada neste estudo, e na maioria descrita na literatura, pode ser explicada pela elevada diversidade dos extratos de fungos empregados, quer seja pela sua composição protéica, quer seja pela variabilidade entre os lotes, ou pelo modo de preparação dos extratos – esporos ou micélios, ou ainda pelo fato de as baterias de testes alérgicos serem limitadas a alguns fungos e estes podem não representar aqueles aos quais os pacientes estejam sensibilizados^{99,100}.

O nível de exposição aos alérgenos é um dos fatores de risco para o desenvolvimento da sensibilização, entre outros fatores¹⁰¹.

Quanto à sensibilização aos outros alérgenos utilizados na realização de teste cutâneo no nosso estudo, com exceção do epitélio de gato, todos os demais estavam presentes, com maior percentual de positividade para *Blomia tropicalis* (80%), *Dermatophagoides farinae* (70%) e *Dermatophagoides pteronyssinus* (60%) . Corroborando o encontrado, no Brasil, estudos epidemiológicos vêm demonstrando a prevalência maior de duas espécies de ácaros: *Blomia tropicalis* ¹⁰² e *Dermatophagoides pteronyssinus* ^{103,104,105} , que se modificam dependendo das condições climáticas, da umidade, da temperatura e dos fatores nutricionais do ambiente. Oliveira et al. (1994) relatam que o principal alérgeno envolvido no desencadeamento de crises asmáticas é a poeira domiciliar . Segundo Castro ¹⁰⁶, 85% dos pacientes com alergia respiratória relatavam o agravamento de suas crises em contato com poeira doméstica e, neste mesmo estudo, encontraram-se provas imunoalérgicas de leitura imediata positiva em 80% dos pacientes para os seguintes antígenos: *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis* . Em Belo Horizonte, os mais frequentes foram *Dermatophagoides farinae*, *Glyciphagus domesticus* e o *Dermatophagoides pteronyssinus* ¹⁰⁷ . Os achados dos estudos citados, e os resultados da nossa pesquisa demonstram a importância da poeira doméstica, e do *Dermatophagoides pteronyssinus*, na fisiopatologia da rinite alérgica em nosso meio.

A influência da exposição a alérgenos ambientais, tanto na sensibilização como na indução de sintomas, tem sido extensamente estudada. O processo de sensibilização pode ou não estar associado ao aparecimento de sintomas clínicos, mas vários estudos mostraram os riscos de exposição a aeroalérgenos na sensibilização e no desenvolvimento de manifestações clínicas das doenças alérgicas ^{108,109} .

Peat et al. ¹¹⁰, em 1999, avaliaram os efeitos de vários fatores ambientais na incidência e gravidade da asma, e concluíram que a exposição aos alérgenos domiciliares se constitui no maior indutor de manifestações alérgicas, principalmente a asma

No presente estudo o inquérito ambiental revelou que em nenhuma das casas foi verificado controle ambiental adequado, em ambos os ambientes avaliados – quarto e sala, o que sugere que as técnicas educativas utilizadas no atendimento, que vêm sendo realizadas no Ambulatório de Alergia, e que pudessem trazer algum benefício para estes pacientes , não estão sendo seguidas. Talvez acreditem que fazendo uso de medicamentos, problemas ambientais não pudessem influenciar na frequência do aparecimento dos sintomas alérgicos. Apesar de existirem dados conflitantes sobre a

efetividade do controle ambiental na criança já sensibilizada, a maioria dos estudos é oriunda apenas de análises de determinado aspecto do controle do ambiente, como medida isolada, nem sempre refletindo o que ocorre no mundo real do paciente. Além disso, algumas pesquisas são insuficientemente controladas, uma vez que algumas apresentam tamanho amostral reduzido e outras analisaram medidas não suficientemente agressivas para reduzir a exposição^{72,73,78,111}. Sakaguchi et al.¹¹² mostraram que os níveis de alérgenos do ácaro da poeira doméstica no ar, no quarto, durante o sono, é 10 vezes maior do que durante as atividades diárias normais nas salas de estar. Já Custovic et al.⁷⁸ demonstraram uma forte correlação entre a cama e níveis de ácaros domésticos como marcadores de severidade da asma, demonstrando a importância do ambiente doméstico, e da condição da cama e dos utensílios nela utilizados, na sensibilização de pessoas para alérgenos ambientais.

É importante ressaltar que, na maior parte da literatura consultada, as medidas de controle ambiental devem fazer parte do tratamento do paciente alérgico, como forma de reduzir tanto a intensidade das crises como o espaço de tempo entre elas; o controle ambiental requer educação e um plano completo para diminuição da exposição alergênica no domicílio, e medidas isoladas têm menor probabilidade de serem eficazes. Entre estas medidas está a orientação para colocação de travesseiro, colchões, entre outros, ao sol, porém esta recomendação é contraditória quando se pensa em fungos, uma vez que Segvic et al.¹¹³, em 2006, relataram que a radiação solar pode apresentar efeitos deletérios sobre alguns fungos, porém para outros, como é o caso de *Alternaria* sp. e *Cladosporium* sp., podem ter sua liberação aumentada em condições de alta radiação. Ainda, estudos controlados conduzidos com *Alternaria* sp. mostraram que, mesmo que haja uma queda da viabilidade, ou metabolismo dos esporos, devido à exposição à luz ultravioleta, não existe diminuição da liberação de alérgenos, o que também ressalta a importância da utilização de metodologia que amostra esporos independentemente da viabilidade¹¹⁴.

A contaminação em travesseiros e acolchoados, já era uma preocupação desde 1936⁷⁰, porém poucos estudos existem sobre esta relação e o aumento da prevalência de asma e rinites. No presente estudo, todos os travesseiros que avaliamos estavam contaminados, tanto na área externa como na interna, inclusive os controles, que foram vendidos como antialérgicos, antiácaros e antimofos.

Observamos, ainda, que o tempo de uso dos travesseiros em relação ao número de unidades formadoras de colônia por metro quadrado, somente foi

significante para os travesseiros com idade de uso superior a sete anos. Na literatura consultada, não foi encontrado nenhum artigo que discutisse esta relação, somente Woodcock et al.⁶⁶, também utilizaram em seus estudos travesseiro com tempo de uso que variavam de 18 meses a 25 anos, porém nenhuma referência sobre a relação quanto ao tempo de uso dos travesseiros foi citada. Siebers et al.¹¹⁵, estudando o efeito das capas impermeáveis em travesseiros e analisadas após seis semanas de uso, observaram uma redução da presença de β -(1,3) – glucano, o que pode ser de relevância clínica para asmáticos, porém estes resultados ainda são questionáveis, quer pelo pequeno período avaliado, quer pelo pequeno número de travesseiros avaliados. Não encontramos estudos que sugerem a periodicidade de troca de capas ou travesseiros, na literatura consultada.

Em relação aos três meios de cultura utilizados e o número de unidades formadoras de colônias produzidas, podemos observar nas tabelas 5 e 6, que o meio SDA foi superior quando comparado aos demais meios, mas eles se revelaram iguais estatisticamente, tanto para os travesseiros controle como para os dos pacientes, porém, como podemos observar na tabela 9, se tivéssemos optado somente por um ou por outro meio, muitos micro-organismos não teriam sido identificados. Sabemos que é bastante diversificada a literatura específica com relação aos meios de cultura, mas, Gava¹¹⁶ em 2002, assim como o encontrado no nosso estudo, recomenda que, para realizar a quantificação de fungos anemófilos, devemos utilizar sempre mais de um meio de cultura, e os mais indicados são o DRBCA e o SDA, sendo que o DRBCA deve ser utilizado em situações de alta concentração de bactérias e fungos de crescimento rápido que possam comprometer a avaliação.

No nosso estudo, o meio DRBCA teve o mesmo desempenho que o observado em outros estudos, como o desenvolvido por King et al.¹¹⁷. Este resultado era esperado devido à composição do meio, que tem como inibidores a rosa bengala e o dicloran que restringem o tamanho das colônias e o cloranfenicol como inibidor de bactérias. Já o meio BDA foi o que apresentou o pior desempenho. Este fato pode ser justificado uma vez que o meio BDA possibilita o crescimento de grande número de espécies fúngicas, muitas delas com crescimento rápido e confluyente como: *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., *Aureobasidium* sp., o que dificulta o crescimento e, ou, visualização de outros gêneros fungicos. O observado no presente estudo difere daquele realizado por Croce et al.¹⁷ em 2003 que utilizou somente o meio BDA, justificando o seu uso por

comodidade no preparo e menor índice de contaminação e por, em estudo anterior, não ter encontrado diferença entre os meios utilizados.

Em relação à média de UFC/m² nas áreas, esta revelou-se com tendência de maior ocorrência na área externa, quando comparada à área interna, tanto nos controles quanto nos pacientes, sendo que três travesseiros eram novos e dois destes estavam com capa recomendada para alérgicos. Em um estudo com crianças de nove a 18 anos de idade, em San Diego – Califórnia, EUA, a exposição de esporos de fungos resultou num aumento de 10 a 30% nos sintomas, para cada 1000 esporos por m³ de ar¹³. Além disso, as epidemias sazonais de asma têm sido relatadas na Inglaterra, e na Nova Zelândia, durante períodos de alta contagem de esporos, e níveis elevados de ascomicetos têm sido associados com asma epidêmica na Inglaterra¹⁴.

Embora a contaminação dentro dos travesseiros tenha sido menos frequente, mesmo nos novos, e naqueles com capas apropriadas, a melhoria do ambiente para pacientes alérgicos realizada nos travesseiros são limitadas, principalmente porque os travesseiros novos que foram analisados, ditos antimoho, antiácaros, também estavam contaminados. Corroborando o encontrado, vários estudos de intervenções ambientais para os pacientes têm sido relatados, e embora os efeitos sobre a diminuição dos níveis de alérgenos sejam confirmados, as implicações clínicas permanecem controversas^{118,119,120}. Dois estudos^{118,119} não apresentaram redução de sinais e sintomas utilizando capas apropriadas, embora em um estudo¹²⁰ os autores observaram que encapando colchões e travesseiros o uso de corticóides inalatórios foi diminuído. Nambu et al. em 2008¹²¹ concluíram que os controles ambientais para os travesseiros quanto a ácaros, que foram utilizados no seu estudo, foram pouco eficazes para fungos, e úteis apenas para prevenção de ácaros no seu interior.

Devemos lembrar que fungos são importantes para as doenças alérgicas^{6, 29,33}, embora a detecção de IgE específica para fungos em pacientes alérgicos seja muito menos frequente do que para ácaros, porém os fungos podem penetrar através das capas impermeáveis e, mais do que isso, manter-se sobre elas, mas poucos estudos têm investigado a contaminação de fungos em travesseiros e colchões, e maneiras eficazes de combatê-los.

A gravidade das doenças alérgicas, principalmente da asma em adultos, está relacionada com a sensibilização e persistência do estímulo antigênico de fungos, em pacientes com esta doença, por longos períodos, em que diferentes graus de bronquiectasias são comuns^{122,123}. Nestes pacientes, a colonização por fungos, e sua

germinação, podem ser um dispositivo de estímulo antigênico, como consequente inflamação persistente das vias aéreas. Exposição durante o sono por causa da contaminação fúngica dos travesseiros e dos colchões pode iniciar ou conduzir o processo. A maior concentração de casos de asma inicia-se na infância, sendo que foi encontrado por Lowe et al.¹²⁴ em 2002, um grande número de provas de função pulmonar anormal em uma grande parcela de crianças com três anos, com histórico familiar de alergia. Isto implica que a lesão pulmonar existente, no início da vida, pode levar ao desenvolvimento de asma. Produtos fúngicos em travesseiros, almofadas e colchões podem danificar as vias aéreas em um momento delicado do seu desenvolvimento.

Chew et al.¹²⁵ observaram em seu estudo pouca correlação entre reservatório e os níveis de fungos no ar, e concluíram que a exposição direta, através de contato com os travesseiros e colchões contaminados por fungos possa ser mais importante do observado até o momento.

Em todos os travesseiros avaliados no presente estudo, encontramos fungos alergênicos, sendo que em relação à diversidade de micro-organismos, esta foi bem superior na área externa dos travesseiros quando comparadas à área interna, tanto para os dos pacientes como para os controles. Os fungos mais frequentes nos travesseiros controle também o foram, via de regra, nos dos pacientes, e não podemos afirmar que este fato não decorra de contaminação prévia, sendo os demais fungos introduzidos no microambiente ao longo da convivência com o usuário. Todos os demais fungos encontrados no nosso estudo foram encontrados em percentual bastante superior aos observados na literatura consultada. No estudo de Nambu et al., foram mais frequentes: *Cladosporium* spp, *Penicillium* sp, *Alternaria alternata*, *Aspergillus* spp e no de Woodcock et al., encontraram como mais frequentes : *Aspergillus fumigatus* (100%), *Aureobasidium pullulans* (60%) e *Rhodotorula mucilaginosa* (60%) , com exceção de *Penicillium* sp. (60%), *Cladosporium* spp. (60%) que também foram encontrados em percentual elevado no nosso estudo. Não encontramos, na literatura consultada, nenhum estudo que tenha utilizado travesseiros novos como controle assim, não dispomos de dados comparativos.

Importante ainda, foi observarmos que, mesmo aspirando a mesma área, muitos micro-organismos não foram identificados em todos os meios. Uma variedade e uma quantidade maior de micro-organismos foi encontrada na parte externa, e os que cresceram com maior frequência foram : *Penicillium* sp.(13,4%), *Candida parapsilosis*

(12,7%), *Cladosporium* sp. (9,8%), *Mycelia sterilia* (7,8%) e *Fonsecaea* sp. (4,1%); na parte interna foram: *Cladosporium* sp. (14,5%), *Penicillium* sp.(14,0%), *Cândida parapsilosis* (12,5%), *Fusarium* sp. (10,0%) e *Aureobasidium pullulans* (7,0%) . Os fungos citados são amplamente distribuídos no mundo e dados de coletas de fungos anemófilos na atmosfera brasileira, apesar de mais raros, são realizados desde 1958 e confirmam a relevância desses gêneros³³.

Exposição a fungos ocorre primariamente em ambientes externos, mas eles penetram em interiores e colonizam materiais ali encontrados, resultando em exposição domiciliar e ocupacional. Como são nutrientes para ácaros, a contaminação por fungos, dentro das residências, aumenta a população daqueles, como consequência temos aumento no número de alérgenos, com risco de múltipla sensibilização³⁵.

Os principais fungos alergênicos são: *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Aureobasidium* sp., *Botrytis* sp., *Cephalosporium* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Drechelera* sp., *Fusarium* sp., *Gliocladium* sp., *Helminthosporium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp., *Scopulariopsis* sp., *Stachybotrys* sp., *Trichoderma* sp., *Trichophyton* sp., *Trichothecium* sp., *Ulocladium* sp., *Saccharomyces* sp., *Cândida* spp., *Epicoccum* sp. e *Stemphylium* sp.^{36,126}, sendo que os de maior importância, até o momento, o *Cladosporium*, o *Alternaria* sp., o *Penicillium* sp. e o *Aspergillus* sp.; e os alérgenos mais bem conhecidos são os provenientes de *Cladosporium herbarium* (Cla h 1 e Cla h 2), *Alternaria alternata* (Alt a 1) e *Aspergillus fumigatus* (Asp f 1)¹²⁷ .

A identificação correta destes agentes não é tarefa simples, havendo muitas divergências entre os diferentes laboratórios. Dessa forma procuramos neste trabalho introduzir as metodologias de identificação molecular, as quais vêm mostrando-se promissora neste campo.

A análise do DNA realizada para algumas espécies, neste estudo , estas o foram pela dificuldade de se identificar alguns fungos , ou em relação à espécie ou gênero, que ao microcultivo se apresentaram muito diferentes entre os gêneros até então identificados e, em um caso pela dificuldade de avaliação . Todas as cepas de fungos processadas molecularmente foram confirmadas quanto ao gênero, exceto em relação *Paecilomyces* spp. Além disso, possibilitou a identificação até o nível de espécie de seis dos oito isolados, confirmando o potencial desta tecnologia. Serviu também, para indicar que a micologia tradicional realizada para os demais isolados deste estudo, encontra-se dentro de uma margem de erro aceitável para este tipo de trabalho, que foi de 87,5% .

Técnicas de identificação molecular, normalmente baseadas na reação da cadeia de polimerase (PCR), tem sido uma das mais executadas, uma vez que permite uma rápida identificação de fungos patogênicos causadores de diversas doenças^{61,62,63,64}. Os resultados de diferentes laboratórios podem ser diretamente comparados, e a publicação de sequências e sua deposição em databases eletrônicas facilitam a confirmação de resultados¹²⁸.

Antes de 1990, pouco se sabia sobre os alérgenos relevantes da *Alternaria alternata*, hoje 13 alérgenos deste fungo estão identificados⁵⁰. Dos gêneros citados, a *Alternaria* sp. é o mais correlacionado com o desenvolvimento, persistência e severidade da asma, sendo que até 70% dos pacientes alérgicos a fungos possuem teste cutâneo positivo para esse gênero¹²⁹. Finalmente, a sensibilização a fungos tem sido associada a graves e, potencialmente, fatais episódios de asma; além disso, a inalação direta de *Penicillium* sp. e *Alternaria* sp. foi relacionada com redução importante da prova de função pulmonar em pacientes sensíveis a estes fungos³.

Outra espécie importante é *Epicoccum nigrum*, única no gênero, que tem demonstrado ser reativa em teste cutâneo de punctura e radioallergosorbent test (RAST) em 20 a 30 % de pacientes com alergia a fungos^{130,131}.

Do exposto, podemos depreender que pouco se conhece sobre fungos e alergia, e muito pouco, ainda, sobre o papel dos reservatórios intradomiciliares, sendo um amplo campo para estudos futuros.

Em Botucatu, estudo realizado por Croce et al.¹⁷ em ambientes externos, encontraram como fungos mais prevalentes, assim como o encontrado pela maioria dos autores, *Cladosporium* sp., seguido de *Epicoccum* sp, leveduras, *Aspergillus* sp., *Helminthosporium* sp. e *Nigrospora* sp.. Ao analisarmos os travesseiros, no presente estudo, pudemos observar que, com exceção do *Cladosporium* sp. a frequência de fungos encontrados difere da de Croce et al.¹⁷, talvez porque eles tenham aspirado o ar exterior, e os travesseiros dos pacientes ficam em ambiente interior. Não podemos, portanto, simplificar e inferir a partir de amostras que não sejam do mesmo meio ambiente.

Dos 42 taxa identificados, 31 (73,8%) podem causar reações alérgicas do Tipo I – IgE mediada, segundo dados disponíveis na literatura atual³, como pudemos observar na figura 10. A *Mycelia sterilia*, apesar de ter sido excluída desta relação, é considerada alergênica com relação clínica não estabelecida³. Porém, todos aqueles micro-organismos que foram excluídos, como causadores de resposta imune tipo I, são

patógenos importantes de diversos tipos de doenças, principalmente como agente oportunista em pacientes imunocomprometidos. A *Candida parapsilosis*, que foi encontrada em elevada frequência nos travesseiros, inclusive nos controles, apresenta-se, desde os anos da década de 1980, como um importante patógeno hospitalar de fungemias, sendo responsável por 7% a 15% das candidemias na maioria das séries publicadas nos EUA e Europa^{132, 133}. Sua ocorrência é ainda maior em crianças e recém-nascidos prematuros internados em unidades de terapia intensiva, onde a prevalência de candidemias por *Candida parapsilosis* é de 17 a 50% dos casos¹³⁴. Assim, o fato de termos encontrado este gênero de fungo em travesseiros, nos sugere que também devemos levar em consideração quando avaliarmos a epidemiologia dos surtos de candidemias, principalmente em unidades de terapia intensiva.

Muitos fungos encontrados, antes apenas considerados contaminantes, hoje são relatados como importantes causadores de doenças em pacientes imunocomprometidos, principalmente como agente causador de infecções hospitalares graves^{135,136,137,138}, incluindo os transplantados.

Os fungos contaminantes do ar fazem parte, principalmente, do grupo dos ascomicetos, que produzem esporos assexuados chamados conídios. Entre esses, está a maioria dos fungos alergênicos dos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* sp¹³⁹. Os esporos dos fungos encontrados no meio externo se infiltram nos ambientes internos especialmente através de portas, janelas e sistemas mecânicos de ventilação. Ao encontrar umidade necessária, esses esporos germinam e se transformam em fungos com micélio germinativo, que vão dar origem a novos esporos e daí a novo ciclo reprodutivo¹⁴⁰. Além de causar doenças por ação direta, alguns fungos produzem micotoxinas, como aflatoxinas, tricotecenos e ocratoxinas, que podem desenvolver câncer, como o carcinoma hepatocelular, e, nefropatias. Essas toxinas são produzidas, principalmente, pelos mesmos fungos encontrados no meio ambiente, espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*¹⁴¹, também encontrados nos travesseiros.

No entanto, a alergia a fungos não é tão bem definida quanto para os outros tipos de alérgenos e, normalmente o diagnóstico é difícil de ser realizado, mesmo porque dificilmente os indivíduos são sensíveis a apenas uma espécie de fungo¹⁴².

Em relação à distribuição dos microrganismos encontrados na área externa dos travesseiros dos pacientes, constatamos que, nos de espuma densa, foi identificado o maior número de micro-organismos, seguido de espuma de flocos, manta acrílica e pena; estas concentrações de micro-organismos também estavam mais frequentes na área interna dos

travesseiros com enchimento de espuma densa (35,5%), seguidos dos com espuma de flocos (32,0%), com manta acrílica (19,8%) e no com pena (12,7%). Não existiu um travesseiro ideal, em que não houvesse crescimento de micro-organismos ou que esse crescimento se desse exclusivamente na parte externa, o que permitiria uma limpeza mais fácil, ou a substituição das capas.

Em relação aos travesseiros dos pacientes, o número médio de micro-organismos foi maior que no controle, sendo que, nos com enchimento com espuma densa, o resultado foi maior tanto nos travesseiros dos pacientes como no controle com este mesmo tipo de enchimento. Nos com enchimento de espuma em flocos, na parte externa houve isolamento de maior número de micro-organismos se comparado ao controle com esse mesmo enchimento. Apesar de não existir nenhum dado disponível na literatura consultada, este fato pode ter ocorrido se considerarmos que os flocos, uma vez que não se constituem uma peça única, podem estar em constantes modificações de forma e, pela sua configuração geométrica, uma mesma face ora está voltada para o interior, ora para exterior. Há que se questionar se o uso, pelo paciente favorece a alteração nas proporções de micro-organismos identificados, segundo área externa e interna, ou se o fato de afofar, isto é, dar uma forma mais confortável anatomicamente, possa colaborar para um maior número de fungos identificados..

Rains et al. em 1999¹⁴³, também evidenciaram uma contaminação maior nos travesseiros sintéticos quando comparados aos de pena, relatando que esta razão é incerta, provavelmente porque o revestimento dos travesseiros sintéticos é mais aberto do que aqueles que revestem os de pena. Apesar de alergia a penas ser muito raro¹⁴⁴, travesseiros com enchimento de penas têm sido tradicionalmente desencorajados entre as pessoas alérgicas, devido ao risco de alergias a este produto^{145,146}, portanto recomendando o uso de travesseiros com enchimento de material sintético, porém com poucas publicações evidenciando que este tipo de enchimento é o mais adequado. Ainda, em relação a este aspecto, Custovic et al.¹⁴⁷ discutem que a capa utilizada nos travesseiros de pena seja tecida de tramas mais fechadas impedindo as penas de saírem e assim impediria a contaminação com pelo de gato e cão dentro dos travesseiros; porém este fato não é verdadeiro em relação aos fungos e algumas bactérias, como detectado no presente estudo.

Em 1995, Strachan et al.¹⁴⁸ fizeram uma observação inesperada de que travesseiros sintéticos estavam associados com um aumento no risco da gravidade da asma, supondo que o material sintético liberaria compostos voláteis, que poderiam aumentar a permeabilidade da mucosa a alérgenos inalantes, porém poderia ser que estes compostos estimulariam a liberação de neurocitocinas em uma mucosa com

inflamação persistente, amplificando a resposta, sem necessariamente serem mediados por IgE, assim como ocorre com ar frio e seco nestes pacientes. Este fato por si só é de importância, porém a participação dos fungos também deve ser considerada.

Dado o tempo gasto dormindo, e a proximidade do travesseiro com a via respiratória, travesseiros com enchimento de espuma sintética, bem como os de pena poderiam ser a fonte primária de fungos e seus produtos; isto tem implicações importantes para os pacientes com doenças respiratórias, especialmente sinusite e asma. Assim, os travesseiros poderiam funcionar como bioindicador de exposição elevada para os alérgenos domésticos e, hospitalares, no caso os fungos.

Em relação aos travesseiros controle, pode-se observar que, no presente estudo, dos três travesseiros avaliados, segundo seu enchimento, o de viscoelástico mostrou-se com menor crescimento de micro-organismos em ambas as áreas; este teve menor crescimento interno quer em valores absolutos ou relativos quando comparado aos demais. Porém devemos ressaltar que, apesar de vendidos como antialérgicos, antifungos, antiácaros, no que diz respeito a antifungo, isto não foi verdadeiro. Estamos adquirindo travesseiros que vêm com carga considerável de fungos sabidamente alergênicos.

Mais estudos são necessários para definir se travesseiros já estão contaminados com fungos mesmo antes de seu uso, haja vista que nenhuma referência foi feita na revisão da literatura realizada, principalmente naqueles que se utilizavam de travesseiros novos nos seus estudos^{149,121}.

Assim, embora a contaminação dentro dos travesseiros tenha sido menos frequente, mesmo nos travesseiros novos, a melhoria do ambiente para pacientes alérgicos com melhor controle dos travesseiros teve aplicação limitada e deve ser repensada.

6.0 – CONCLUSÕES

- 4,46% dos pacientes do Ambulatório de Alergia e Imunologia, que realizaram teste de sensibilização, eram positivo para os fungos testados;
 - A maioria dos pacientes era sensibilizada a mais de um alérgeno, os mais frequentes foram: *Dermatophagoides farinae* , *Dermatophagoides Pteronyssinus* , *Blomia tropicalis* e fungos;
 - 80% dos pacientes tinham rinite e 50% também tinham asma;
 - Nenhum ambiente avaliado no domicílio dos pacientes revelou-se adequado para pacientes alérgicos;
 - Somente dois travesseiros tinham capa adequada e se encontravam visivelmente limpos;
 - Todos os travesseiros dos pacientes estavam contaminados com fungos e, em alguns deles, também se encontrou presença de bactérias e bacilos grão-positivos tanto na área externa como na interna;
 - Todos os travesseiros controle estavam contaminados com fungos, embora segundo o fabricante todos eram antialérgicos, antiácaros e anti- mofo;
 - A média de UFC/m² foi estatisticamente superior nos travesseiros com tempo de uso superior a sete anos;
 - O meio de cultura melhor avaliado foi o SDA, revelando-se superiores aos demais meios utilizados, porém se tivéssemos utilizado um único meio, muitos micro-organismos não teriam sido identificados;
 - A média de UFC/m² foi maior na área externa quando comparada à área interna dos travesseiros dos pacientes e dos controles;
 - A diversidade e a quantidade de micro-organismos foi superior nos travesseiros dos pacientes quando comparados aos controles, sendo que os fungos mais frequentes foram *Candida parapsilosis*, *Cladosporium* sp., *Mycelia sterilia* e *Penicillium* sp.;
-

- Nenhum tipo de enchimento foi considerado ideal, entre os dos pacientes, o que apresentou menor nível de contaminação foi o de pena; em relação ao controle, foi o de viscoelástico;
 - A identificação molecular confirmou os achados obtidos com os métodos tradicionais em nível de gênero em 87,5% e possibilitou a identificação de espécie em 75%.
-

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- 1 Pope AM. Agents, sources, sources controls and diseases. In: Pope AM, Patterson R, Burge H. Indoor allergens: assessing and controlling adverse health effects. Washigton: National Academy Press; 1993.p 86-130.
- 2 Ring J, Kramer U, Schafer T, Bechrendt H. Why are allergies increasing ? Curr Opin Immunol .2001;13:701-8.
- 3 Adkinson Jr NF, Bochner BC, Busse WW, Holgate ST, Lemanske Jr RF, Simons FE. Middleton`s Allergy. Principes & Praticce. Philadelphia: Elsevier; 2009; 1743p.
- 4 Souza GG. Exposição a alérgenos inalantes domiciliares entre pacientes asmáticos de Uberlândia – MG [Monografia] Uberlândia: Centro de Ciências Biomédicas., Universidade Federal de Uberlândia; 1998.
- 5 Camargos PAM, Rodrigues, MESM, Sole, D, Scheinmann P. Asma e rinite como expressão de uma única doença: um paradigma em construção. J Pediatr (Rio J). 2002;78 (supl 2): S123 – 8.
- 6 Campos HS. O preço da asma. In: Lopes AC. Asma um grande desafio. São Paulo: Brasil. Atheneu ;2004. p. 209 – 26.
- 7 Bousquet J, Van Cauwenberge P. Allergy lternat and its impacto on asthma. J Allergy Clin Immunol. 2001;108:147 -334.
- 8 Gregory C, Cifaldi M, Tanner LA. Targeted intervention programs : creating a lternate practice model improve the treatment of allergic lternat in a managed care population. J Manag Care.1999;5: 485-90.
- 9 Barner K, Brenner R. Quality of housing and allergy to cockroaches in the Dominican republic. Int Arch allergy Immunol.1996;109: 68-72.
- 10 Wynands LM, Deisz WD, Van Leusden FM. Marker antigens to asses exposure to molds and their allergens. Allergy.2000;55:850-5.
- 11 Bierman WC, Van Arsdel Jr PP. Clinical evaluation of the patient with allergic and immunologic disease. In:Lockey RF, editor. Principles of Immunology and Allergy. Philadelphia: WB Saunders; 1987. p.1-26.
- 12 Viswanath PK, Horng-Der S, Banani B. Respiratory fungal allergy. Microbes Infect.2000; 2:1101-10.
- 13 Delfino RJ, Coate BD, Zeiger RS. Daily asthma severity in relation to personal ozone exposure and outdoor fungal spores. Am J Resp Crit Care Med. 1996;154.

-
- 14 Horner WE, Helbling A, Salvaggio JE, Lehrer SB. Fungal allergy. Clin Microbiol Rev.1995;8:161-79.
 - 15 Nelson H, Szefer SJ, Jacob J, Huss K, Shapiro G, Stenberg AL. J Allergy Clin Immunol.1999;104:775 -85.
 - 16 Lasley MV, Shapiro GG. Testing for allergy. Pediatr Rev. 2000;21:39-43.
 - 17 Cocre J, Silva EGM, Furtado EL, Queluz THAT . Estudo dos fungos anemófilos da cidade de Botucatu e sua correlação com sensibilização em pacientes com doenças alérgicas respiratórias. Rev Bras Alerg Imunopatol .2003;26: 95-108.
 - 18 Dhillon M. Current *status* of mold immunotherapy. Ann Allergy.1991;66:385-92.
 - 19 Keller MB, Lowenstein SR. Epidemiology of asthma. Semin Respir Crit Care Med.2002;23:317-30.
 - 20 Emanuel MB. Hay fever, a post industrial revolution epidemic : a history of its growth during the 19th century. Clin Allergy.1988;18:295-304.
 - 21 Burr ML, Butland BK, King S, Vaugh-Williams E. Changes in asthma prevalence: two survey 15 years apart. Arch Dis Child.1989;64:1452-6.
 - 22 Aberg N, Hesselman B, Aberg B, Eriksson B. Increase of asthma , allergic lternat and eczema in Swedish schoolchildren between 1979 and 1991. Clin Exp Allergy.1995; 25:815-9.
 - 23 Carandina L. Prevalência de sintomas sugestivos de doenças respiratórias crônicas inespecíficas na população urbana de Botucatu, São Paulo [tese] . São Paulo: Faculdade de Saúde Publica, Universidade de São Paulo; 1986.
 - 24 Denning DW, O'Driscoll BR, Powell G, Chew F, Atherton GT, Vyas A, et al . Randomized controlled Trial of oral antifungal treatment for severe asthma with fungal sensitization. Am J Resp Crit Care Med.2009;179:11 – 8.
 - 25 Lau S, ILLi S, Sommerfeld C, Niggermann R. Early exposure to house dust mite and cat allergens and development of childhood asthma: a cohort study. Lancet. 2000;356:1392 -7.
 - 26 Wahn U, Von Mutius E. Childhood risk factors for atopy and the importance of early intervention. J Allergy Clin Immunol.1997;100:2-24.
 - 27 Pinto RJC, Croce J, Kalil J, Giannini MJM, Costa PI, Gambale W. Fungos em péletes de laranja e alergia respiratória em trabalhadores da indústria citrícola. Rev Bras Alergia Imunopatol.2003;26:152- 8.
-

-
- 28 Bernard – Bonin AC, Pelletier H, Allard-Dansereau C, Chabot G, Masson P, Maheux B, et al . Parenteral knowledge about their asthmatic children. *Pediatric*.1991;46:489-97.
 - 29 Arruda LK, Rizzo MC, Chapman MD, Fernandes-Caldas E, Bagatto D, Platts-Mills TAE, et al. Exposure and sensitization dust mite allergens among asthmatic children in São Paulo, Brazil. *Clin Exp Allergy*.1991;21:433-59.
 - 30 Faria NA. Aspectos ecológicos e clínicos da flora micótica anemófila de Belo Horizonte [tese]. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; 1987.
 - 31 Lee TH. Precipitating factors of asthma. *Med Bull*.1992;48:168-78.
 - 32 Lindfors A, Wickman M. Indoor environmental risk factors in young asthmatics : a case-control study. *Arch Dis Child*.1995;73:408-12.
 - 33 Alecrim I, Teixeira H. Fungos anemófilos na cidade do Recife (Pernambuco, Brasil). *An Fac Med Univ Recife*.1958;18:269-74.
 - 34 Machado GMR. Fungos anemófilos de áreas do Grande Recife [dissertação]. Recife: Centro de Ciências da Saúde do Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco; 1979.
 - 35 Green BJ, Mitakakis TZ, Tovey ER. Allergy detection from 11 fungal species before and after germination. *J Allerg Clin Immunol* .2003;2:285-9 .
 - 36 Kurup VP, Shen HD, Banani B. Respiratory fungal allergy. *Microbes Infect*. 2000;2:1101 -10.
 - 37 Guneser S, Atici A, Koksall F, Yaman A. Mold allergy in Adana, Turkey. *Allergol Immunopathol*.1994;22: 52-4.
 - 38 Horak B, Dutkiewicz J, Solarz K. Microflora and acarofauna of bed dust from homes in Upper Silesia, Poland. *Ann Allergy Asthma Immunol*.1996;76:41-50.
 - 39 Escudero AI, Sanchez-Guerrero IM, Mora AM, Soriano V, Lopez JD, Garcia FJ, et al. Cost effectiveness of various methods of diagnosing hypersensitivity to *Alternaria*. *Allergol Immunopathol*.1993;21:153-7.
 - 40 Malling HJ, Dreborg S, Weeke B. Diagnosis and immunotherapy of mold allergy. *Allergy*.1987;42: 305-14.
 - 41 Yamaguchi H. Evaluation of immediate hypersensitivity and environmental factors by intracutaneous skin test and test specific IgE antibodies in allergic children. *Allergy*.1993;42:571-81.
-

-
- 42 Kozak Jr PP, Gallup J, Cummins LH, Gillman AS. Fatores de importância na determinação da prevalência de mofo. *Ann Allergy*.1979;43: 88-94.
- 43 Green BJ, Sercombe JK, Tovey ER. Fungal fragments and undocumented conidia function as new aeroallergen sources. *J Allerg Clin Immunol*.2005;115:1043 -8.
- 44 Portnoy J, Chapman J, Burge H, Muilemberg M, Solomon W. *Epicoccum* allergy: skin reaction patterns and spore/mycelium disparities recognized by IgG and IgE ELISA inhibition. *Ann Allergy*.1987;59:39-43.
- 45 Gravesen S. Microfungal contamination of damp buildings: biological aspects. In: *Bioaerosols, Fungi and Mycotoxins*. Ed Johanning E. New York: Eastern New York Occupational and Environmental Health Center;1999.p.505-11.
- 46 Hagy GW, Settipane GA. Bronchial asthma allergic rhinitis, and allergy skin tests among college students. *J Allergy*.1969;44:323-32.
- 47 Burge HA. Fungus allergens. *Clin Rev Allergy*.1985;3:319-29.
- 48 Beaumont F, Kauffman HF, Sluiter HJ, De-Vries K. Sequential sampling of fungal air spores inside and outside the homes of mold sensitive, asthmatic patients: a search for a relationship to obstructive reactions. *Ann Allergy*.1985; 55:740-6.
- 49 Lippalainen S, Lindoors O, Reijula K. *Bioaerosols. Fungi and mycotoxins: health effects assessment, prevention and control*, eastern New York Occupational and Environmental Health Center. New York: Ed Albany;1999. p. 616-9.
- 50 Nobble BS, Denk V, Pole V, Breitenbach M. The spectrum of fungal allergy. *Int Arch Allergy Immunol*.2008;145:58-86.
- 51 Rowan NJ, Hohnstone CM, Mclean RC, Anderson JG, Clarke A. Prediction of toxigenic fungal growth in Buildings by using a novel alternat system. *Appl Environm Microb*.1999;65:4814 -21.
- 52 Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. In: *Lacaz CS. Micologia médica*. 8a Ed. São Paulo: Ed Sarvier;1991. p. 483- 90.
- 53 Alexopoulos C J, Mims CW, Blackwell M. *Introductory Mycology*. 4a Ed. New York: Blackwell;1996. 896p.
- 54 Wanke,B , Lazéra MS, Nucci, M. Fungal infections in the immunocompromised
-

-
- host. Mem Inst Oswaldo Cruz.2000;95:153-8.
- 55 Chapman JA. How relevant are pollen and mold spore counts to clinical practice? Ann Allergy Asthma Immunol. 2000;84:467-8.
 - 56 Menezes EA, Alcanfor AC, Cunha FA. Fungos anemófilos na sala de periódicos da biblioteca de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará. RBAC. 2006; 38: 155-8.
 - 57 Viswanath P K. Fungal allergens .Curr Allerg Asthma Rep. 2003;3:416-423.
 - 58 Hyde H A. Atmospheric spores and spores in relation to allergy. Clin allergy. 1973;2:153-79.
 - 59 Rutherford S, Simpson R, Willians G, Mitchel LC, McCall B. Relationships between environmental factors and lung function of asthmatic subjects in South East queensland. J Occup Environ Med. 2000; 42:882-91.
 - 60 Guarro J, Gene J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. Clin Microb Rev.1999;12:454-500 .
 - 61 White PL, Shetty A, Barnes RA. Detection of seven *Candida* species using the light-cycler system. J Med Microbiol.2003;52:229-38.
 - 62 Xu J, Boyd CM, Livingston E, Meyer W, Madden JF, Mitchell TG. Species and genotypic diversities and similarities of pathogenic yeasts colonizing women. J Clin Microbiol.1999;37:3835-43.
 - 63 Kambe T, Horii T, Arishima T, Ozeki M, Kikuchi A. PCR based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. Yeast. 2002;19: 973-89.
 - 64 McCullough MJ, DiSalvo AF, Clemons KV, Park P, Stevens DA. Molecular epidemiology of *Blastomyces dermatitidis* . Clin Infect Dis.2000;30:328 -35.
 - 65 Pagán Alemán JA, Alvarez JMN, Garcia JH, Garcia FJS,. Hipersensibilid inmediata a hongos, valoración clínica y correlación de pruebas cutáneas con test de liberación de histamina. Comunicación al XIV Congreso Nacional del SEAIC.1984; 33:12.
 - 66 Woodcock AA, Stell N, Moore CB, Howad SJ, Custvic A, Denning DW. Fungal contamination of bedding. Allergy. 2006; 61:140-2.
 - 67 Infante-Rivard C. Childhood asthma and indoor environmental risk factors. Am J Epidemiol.1993;137:834- 44.
 - 68 Pak JH, Schleiff PL, Cox-Ganser JM. Building related respiratory symptoms can
-

-
- be predicted with semi-quantitative indices of exposure to dampness and mold. *Indoor Air*.2004;14:425-33.
- 69 Butland BK, Strachan DP, Andersom HR. The home environment and asthma symptoms in childhood: two population based case-control studies 13 years apart. *Thorax* .1997;52: 618-24.
- 70 Conant NF, Wagner HC, Rackemann FM. Fungi found in pillows, mattress and furniture. *J Allergy*.1936;7:147-62.
- 71 Young S, Le Souëf PN, Geelhoed GC et al. The influence of a family history of asthma and parental smoking on airway responsiveness in early infancy. *N Engl J Med*.1991; 324:1168-73.
- 72 Bollinger ME, Eggeston PA, Flanagan E. Cat antigen in homes with or without cats may induce allergic symptoms. *J Allerg Clin Immunol* .1996; 97:907-14.
- 73 Brow MA, Halonen Mj, Martinez FD. Cutting the cord: is the birth already too late for primary prevention of allergy? *Clin Exp Allergy*. 1997;27: 4-6.
- 74 Custovic A , Taggart SCO, Kennaugh J, Woodcock Al. Portable dehumidifiers in the control of house dust mites and mites allergens. *Clin Exp Allergy*. 1995;25:312-6.
- 75 Reis AP. Controle ambiental nas doenças alérgicas: pros e contras. *Rev Bras Alergia Imunopatol*.1998; 21:112-21.
- 76 Sarinho ESC. Sensibilização aos ácaros domésticos em crianças atópicas e não-atópicas de Recife- PE, Brasil. *Rev Bras Alergia Imunopatol*.2000; 23:105-10.
- 77 Colloff MJ, Ayres J, Carswell F. The control of allergens of dust mites and domestic pets: a position paper. *Clin Exp Allergy*.1992; 22:1-28.
- 78 Custovic A, Taggart SC, Franais HC. Exposure to house dust allergens and the clinical activity of asthma. *J Allerg Clin Immunol* .1996; 98:64-72.
- 79 Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Hold BJ. Development of Internat-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet*. 1999; 353: 196 - 200.
- 80 Halken S . Early sensitization and development of allergic disease – risk factors and predictors. *Paed Resp Rev*.2003;4:128-34.
- 81 Coultas DB, Samet JM. Epidemiology and natural history of childhood asthma. In: Tinkelman DG, Falliers CJ, Naspitz CK. *Childhood Asthma: pathophysiology and treatment*. New York: Marcel Dekker;1987.p.131-57.
-

-
- 82 Ferreira MAR. Inflammation in allergy asthma: initiation events, immunological response and risk factors. *Respirology*. 2004; 9:16-24.
- 83 Dold S, Wsjt M, Von Mutius E, Reitmeir P, Stiepel E. Genetic risk for asthma, allergic iternat, and atopic dermatitis. *Arch Dis Child* .1992; 67:1018-22.
- 84 Mello JR, Mion JFO. Guia de avaliação ambiental do alérgico. São Paulo: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo HC-FMUSP; 2000 .
- 85 Pitt JI, Hocking AD. Foodand drug admistration: bacteriological analytical manual. 8 ed Gaithersburg : AOAC International. In: Pitt JI, Hocking AD. Fungi and food spoilage. 2 nd ed. London: Blackie Academic & Professional; 1997.
- 86 Trabulsi LR, Altathum F, Gompertz OF, Candeias JAN. Microbiologia. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 1999. p.421- 2.
- 87 Lacaz CS, Porto E, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. São Paulo: Sarvier; 1998.
- 88 Hoog GS, Guarro J, Genê J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi. 2nd . Washington: ed ASM Press; 2000.
- 89 García-Martos P, García-Agudo R, Hernández-Molina JM, Marín P, Tarello E, Mira J. Identification de lternate de interés clínico en el medio de cultivo CHROMagar *Candida*. *Rev Iberoam Micol*.1998;15:131-5.
- 90 Simon-Nobbe B, Denk U, Rid R, Breitenbach M. The spectrum of fungal allergy .*Int Arch Allergy Immunol*, 2008;145:58-86.
- 91 Arabatzis M, Velegraki A. Aspergillus versicolor isolate UOA/HCPF 8709 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; international transcribe spacer 1,5.8S lternate RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S lternate RNA gene, partial sequence. .[Internet]. Unpublished – Submitted 30 mar 2009 Mycology Laboratory, Medical Microbiology. www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/
- 92 Kitpreechavanich V, Maneeboon T, kayano Y, Sakai K. Comparative characterization of l-lactic acid-producing thermotolerant Rhizopus fungi. *J Biosci Bioeng* . 008;106:541 – 6.
- 93 Li S, Yu L. Sequencing of endophytic fungi in Vaccinium.[Internet]. Unpublished, Submitted 10 mar 2009. Hong . Macao:Horticulture, Jinlin Agricultural University; 2009. www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/
-

- 94 Peterson RA, Bradner JR, Roberts TH, Nevalainen KM. Fungi from Kaola faeces exhibit a range of enzyme activities against recalcitrant substrates. *Lett Appl Microbiol.* 2009;48:218-25.
- 95 Lygis V, Vasiliauskaite I, Stenlid j, Vasaitis R. Impact of Forest fire on occurrence of fungi in roots of Pinus mugo of heterobasidion annosum. *Foresty Int J Forest Res.* 2009; 83: 83-92.
- 96 Castelli MV, Alastruey-Izquierdo A, Cuest I, Monzon A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, et al.. Susceptibility testing and molecular classification of *Paecilomyces* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:926-8.
- 97 Hong C, Ming FT, Shinn-Shing L, Hsiao-Yun T, Ching-Yun C, Chang-Ter C, Horng-Der S. A vacuolar serine protease is a major allergen of *Rhodotorula mucilaginosa* and belongs to a class of highly conserved pan-fungal allergens. *Int Arch Allergy Immunol.* 2005;138:134-41.
- 98 Vouge MW, Thaker AJ, Curran IHA, Zhang L, Muradia G, Rode H, et al.. Isolation and expression of a cDNA clone encoding an *Alternaria alternata* (Alt a 1 subunit). *Int Arch Allergy Immunol.* 1996; 111:385 -95.
- 99 Ford A. Characterization of moulds. In: *purification y estandarización de alérgenos*. Madrid. Abello; 1982. p 43 -53.
- 100 Marques SPO. Extratos alérgicos brutos obtidos por extração com líquidos de coca e tris-HCl das fases vegetativas e reprodutivas de *Pleurotus ostreatus* análise bioquímica e alérgica [Dissertação] Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo; 1997.
- 101 Olbrich Neto J, Leite MA, Resende IJC, Zuliani A, Olbrich SRLR, Correa AA. Frequência de positividade a alérgenos detectada por teste cutâneo em trabalhadores de biblioteca e arquivo de prontuários médicos. *Rev Ciênc Med.* 2008; 17:13 -20.
- 102 Medeiros JRM, Figueiredo JP. Sensibilização a aeroalérgenos em indivíduos com asma brônquica e/ou rinite crônica em Salvador, Bahia. *Rev Bras Alergia Immunopatol.* 1997; 20:143-54.
- 103 Fain A. Allergies respiratoires produites par un Acarien (*Dematophagoides pteronyssinus*) vivant dans les poussières des habitations. *Bull Acad R Med Belg.* 1966; 6:479-500.
- 104 Negreiros EB, Filarid C, Tebyriça JN. Alergia ao pó de casa; estudo

- comparativo entre os extratos totais do pó de casa – *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae* em pacientes do Rio de Janeiro. *Folha Med.*1975;71:385-8.
- 105 Flechtmann CHW, Rosa AE. Estudo da fauna acarina da poeira domiciliar no Brasil. *Rev Bras Alergia Imunol.*1980;2: 91-4.
- 106 Castro FFM. Rinite Alérgica: modernas abordagens para uma clássica questão. São Paulo: Lemos Editorial e Gráficos; 1997.
- 107 Moreira NS. Acarinos Pyroglyphidae e outros Sarcoptiformes em amostras de pó domiciliar em Belo Horizonte, MG. Belo Horizonte [Dissertação] Zoologia e Parasitologia – Instituto de Ciências Biológicas da UFMG; 1975.
- 108 Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TAE, Cogswell JJ. Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood. A prospective study. *N Engl J Med.*1990; 323: 502 -7.
- 109 Platts-Mills TA, Vervloet D, Thomas WR, Aalberse RC, Chapman MD. Indoor allergens and asthma : report of the Third Internacional Workshop. *J Allerg Clin Immunol.*1997; 100:S2 – S24.
- 110 Peat JK, Li J. revering the trend: reducing the prevalence of asthma. *J Allerg Clin Immunol.* 1999; 103:1-10.
- 111 Melo RMB, Lima LS, Sarinho ESC. Associação entre controle ambiental domiciliar e exacerbação de asma em crianças e adolescentes do município de Camaragibe, Pernambuco. *J Bras Pneumol.*2005; 31:5-12.
- 112 Sakaguchi M, Inouye S, Miyazawa H, Kamimura H, Kimura M, Yamazaki S . Evaluation of countermeasures for reduction of mouse airborne allergens. *Lab Anim Sci* . 1990; 40:613-5.
- 113 Segvic KM, Pepeljnjak S. A yersrs-round aeromycological study in Zagreb área, Croatia. *Ann Agric Environ Med.* 2006; 13: 55-64.
- 114 MitaKakis TZ, O`Meara TJ, Tovey ER. The effect of sunlight on allergen release from spores of the fungus *Alternaria* . *Grana* 2003; 43 : 43 – 6.
- 115 Siebers R, Parkers A, Moleiro JD, Guindaste J. Effect of allergen-impermeable covers on β -(1,3) – glucan contento f pillows. *Allergy.* 2007; 62: 451 -2 .
- 116 Gava MA. Desempenho de diferentes meios de cultura utilizados na avaliação de fungos presentes em ambientes de produção de alimentos [Dissertação]. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP. 2002.

-
- 117 King AD, Hocking Ad, Pitt JI. Dicloran Rose Bengala médium for enumeration and isolation of molds foods. *Appl Environ Microbiol.* 1979; 37:959-64.
- 118 Woodcock A, Forster L, Mathews E, Martin J, Letley L, Vickers M, et al.. Control of exposure to mite allergen and allergen-impermeable bed covers for adults with asthma. *N Engl J Med.* 2003; 349: 225-36.
- 119 Terrehorst J, Hak E, Oosting AJ, Tempels-Pavlica Z, Monchy JGR, Aalberse RC et al. Evaluation of impermeable covers for bedding in patients with allergic rhinitis. *N Engl J Med.* 2003; 349: 237-46.
- 120 Halken S, Host A, Niklassen U, Hansen LG, Nielson F, Peterson S, et al . Effect of mattress and pillow encasing on children with asthma and house dust mite allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 111:169 – 76.
- 121 Nambu M, Shirai H, Sakaguchi M, Aikara M, Takatori K. Effect of house dust mite- free pillow on clinical course of asthma and IgE level- A randomized, Double-blind, controlled study. *Pediatr Asthma Allergy Immunol.* 2008; 21: 137 - 44.
- 122 Zureik M, Neukirch C, Leynaert B, Liard R, Bousquet J. Sensitisation to airborne moulds and severity of asthma: cross sectional study from European Community respiratory health survey. *Br Med J.* 2002; 325: 411-5.
- 123 O'Driscoll BR, Hopkinson LC, Denning DW. Mould sensitisation is common amongst patients with severe asthma requiring multiple hospital admissions in North West England. *BMC Pulm Med.* 2005; 5:4.
- 124 Lowe L, Murray CS, Custovic A, Simpson BM, Kissen PM, Woodcock A. Specific airway resistance in three year-old children. *Lancet.* 2002; 359:1904- 8.
- 125 Chew GL, Rogres C, Burge HÁ, Muilembreg ML, Gold DR. Dustborne and airborne fungal propagules represent a different spectrum of fungi with different relations to home characteristics. *Allergy.* 2003; 58 :13-20.
- 126 Menezes EA, Gambale W, Macedo MS, Castro F, Paula CR, Croce J. Characterization of allergenic fractions from *Dreschelera monóceras*. *J Invest Allerg Clin Immunol.* 1998; 8:214-8.
- 127 Busch RK, Portnoy JM. The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 107(suppl 3) : S 430-40 .
- 128 Bruns TD, White TJ, Taylor JW. Fungal molecular systematics. *Annu Rev Ecol Syst.* 1991; 22:525-64 .
-

-
- 129 Bush RK, Prochnau JJ. Sensitivity to fungal allergens is a risk factor for life-threatening asthma. *Allergy*. 2000;55: 510-4.
- 130 Hensel HM, Prince HE, Meyer GH. Studies with two genera of tuberculariaceae : *Epicoccum* and *Fusarium*. *Ann Allergy*. 1974;32:121- 26.
- 131 Portonoy J, Chapman J, Burge H. *Epicoccum* allergy: skin reaction patterns and spore mycelium disparities recognized by IgG and IgE ELISA inhibitin. *Ann Allergy*. 1987; 59: 39- 43 .
- 132 Pfaller MA. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. *Clin Infect Dis*. 1996; supp 2: S89-S94.
- 133 Voss A, Kluytmans JA, Koeleman JG, Spanjaard L, Vandenbroucke-Grauls CM, Verbrugh HA, et al.. Occurrence of yeast bloodstream infections between 1987 and 1995 in five Dutch university hospitals. *Europ J Clin Microbiol Infect Dis*. 1996; 15: 909-12.
- 134 Levy I. Emergence of *Candida parapsilosis* as the predominant species causing candidemia in children. *Clin Infect Dis*. 1998; 26: 1086- 8.
- 135 Colombo AL, Guimarães T, Silva, LR, De Almeida Monfardini, LP, Cunha AK, Rady P, et al.. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007; 8: 570-6.
- 136 Ruiz LS, Sugizaki MF, Montelli AC, Matsumoto FE, Pires MFC, Da Silva AM, et al. Fungemia by yeast : occurrence and phenotypic study of strains isolated at the public hospital. *J Micol Medical*. 2005; 15:13-21 .
- 137 Bushelman SJ, Callen JP, Roth DN. Disseminated *Fusarium solani* infection. *J Am Acad Dermatol*. 1995; 32:346-51.
- 138 Wey SA, Viscoli C, Girmenia C, Marinus A. Candidemia in cancer patients: a retrospective, multicenter surveillance study by the invasive fungal infection Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *Clin Infect Dis*. 1996; 95:19-28.
- 139 Horner WE, Barnes C, Codina R, Levetin E. Guide for interpreting reports from inspections/investigations of indoor mold. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 121:592-7.
- 140 Horner WE, Barnes C, Codina R, Levetin E. Guide for interpreting reports from inspections/investigations of indoor mold. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;
-

-
- 121:592-7.
- 141 Bando E, Gonçalves LN, Tamura NK, Machinski Júnior M. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. *J Bras Patol Med Lab.* 2007; 43:175-80.
- 142 Levetin E, Horner WE. Fungal aerobiology : exposure and measurement. *Chen Immunol* 2002; 81: 10-27.
- 143 Rains N, Siebers J, Crane J, Fitzharris P. House dust mite allergen (Der p 1) accumulation on new synthetic and feather pillows . *Clin Exp Allergy.* 1999; 29: 182 – 5.
- 144 Kilpio K, Makinem- Kijunem S, Haahtela T, Hannuksela M. Allergy to feathers. *Allergy.*1998; 53:159-64.
- 145 Shatz g, Sullivan TJ, Kuleczyck A, Zull D. Feather pillow and allergic patients. *Ann Allergy.*1982; 48:59.
- 146 Tattersfield AE . Management and treatment. In: Brewiss RAL, Corrin B. *respiratory medicine.* London: WB Saunders. 1995. p.1199-20 .
- 147 Custovic A, Hallam C, Woodcock H, Simpson B, Houghton N, Simpson A. Synthetic pillows contain higher levels of cat and dog allergen than feather pillows . *Pediatr Allergy Immunol.*2000;11:71-5 .
- 148 Strachan DP, Carey IM. Home environment and severe asthma in adolescence : a population based case- control study. *Br Med J.* 1995; 311:1053 -6.
- 149 Kemp TJ, Siebers RW, Fishwick D, Grady GBO, Fitzharris P, Crane J. House dust mite allergen in pillows . *BMJ .*1996; 313-16 .
-

ANEXOS

Anexo1

Ficha de avaliação dos pacientes , domicílio e travesseiros

nº

Nome: _____ RG: _____

Idade: _____ Cidade: _____ Bairro: _____ telefone : _____

Endereço: _____ nº _____

Diagnóstico: _____

Teste Alérgico : ____/____/____ Positivo() Negativo ()

CP: _____mm PD: _____mm DF: _____mm Dp : _____mm Fungos: _____mm CA: _____mm

Cão: _____mm Gato: _____mm Penas: _____mm Bg: _____mm Pa: _____mm Blo : _____mm

Polens: _____mm Tabaco: _____mm Lã : _____mm Alg: _____mm Piretro: _____mm

Capim: _____mm Epit. Bov: _____mm Epi Equi: _____mm

GUIA DE AVALIAÇÃO AMBIENTAL

QUARTO :

Quanto tempo (hs) permanece no quarto : () dormir () Brincar

1- Carpete : () Não tem () menos de 5 anos () mais de 5 anos

2- Tapetes: () Não tem () Fino () espesso Lavado com que frequência (_____ dias)

3 – Cortinas () Não tem Lavado com que frequência (_____ dias)

4- Camas:

a) Travesseiro : () espuma com capa adequada () espuma sem capa () penas com capa () pena sem capa () outro Lavado com que frequência (_____ dias)

b) Colchão: () espuma sem capa () espuma com capa () mola e espuma sem capa () mola e espuma com capa () fibras naturais sem capa () fibra s naturais com capa Lavado com que frequência (_____ dias)

c) Cobertores : () lã sem capa () lã com capa () fibra acrílica com capa () fibra acrílica com capa () edredom de fibra artificial () edredom de fibras naturais e, ou , pena () Lavado com que frequência (_____ dias)

d) Forros, almofadas : () Colchas () almofadas de espuma () almofadas de penas () bichos de pelúcia. Lavado com que frequência _____ dias

5 – Paredes : () sem umidade () com umidade- manchas

6- Ambiente : () arejado com sol () arejado sem sol () não arejado e úmido () não arejado e seco

7 – Armários e cômodas : () sem armário () armário embutido () outros tipos.

Quais ? _____

8 – Animais (pelos ou penas) : () não tem () animal não entra no quarto () animal entra no quarto . Qual? _____

9 – Tabagismo : () não fuma () ninguém fuma no quarto () fuma-se no quarto

10 – Presença de irritantes no ambiente : () nenhum () incenso () odorantes () inseticidas, () perfume () outros. Qual _____

11 – Presença de vasos com planta : () nenhum () vasos limpos periodicamente () vasos com umidade

OUTROS AMBIENTES DA CASA

Quanto tempo permanece no local : () dormir () Brincar

1- Carpete : () Não tem () menos de 5 anos () mais de 5 anos

2- Tapetes: () Não tem () Fino () espesso Lavado com que frequência (_____ dias)

3 – Cortinas () Não tem Lavado com que frequência (_____ dias)

4 – Sofá e poltronas

a) Forração : () couro, tecidos plastificados () outros tecidos. Qual? _____

b) Almofadas : () não tem () espuma cobertas com tecido plastificado ou couro () de pena ou fibras naturais . Lavado com que frequência (_____ dias)

c) Coberturas : () couro ou tecido plastificado () outros tecidos

- 5 – Paredes : () sem umidade () com umidade- manchas
6- Ambiente : () arejado com sol () arejado sem sol () não arejado e úmido () não arejado e seco
7 – Armários e cômodas : () sem armário () armário embutido () outros tipos
8 – Animais (pelos ou penas) : () não tem () animal não entra na casa () animal entra na casa
9 – Tabagismo : () não fuma () ninguém fuma no quarto () fuma-se no quarto
10 – Presença de irritantes no ambiente : () nenhum () incenso () odorantes () inseticidas () perfume () outros. Qual
11 – Presença de vasos com planta : () nenhum () vasos limpos periodicamente () vasos com umidade
12 – Região em que mora : () área poluída () área não poluída

AMOSTRA TRAVESSEIRO

1- aspirado: _____
amostra: _____

REALIZADO ____/____/____ ASSINATURA: _____

Anexo2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU - *Departamento de enfermagem*

BOTUCATU, SP - RUBIÃO JÚNIOR - CEP 18618-970 – Telefone (014) 6802-6070/6802-6004 - FAX (014) 6823- 5264

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

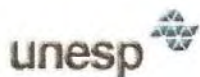
Eu, _____ (responsável) pelo paciente menor de idade _____ RG: _____, autorizo a participação no projeto de pesquisa intitulado” **Estudo da prevalência de fungos em travesseiros de crianças com rinite e, ou, asma**”, que será realizado nesta unidade de ensino e pesquisa, estando ciente da necessidade da consulta ao prontuário, responder a entrevista que consta no anexo1, doação do travesseiros, com imediato recebimento de outro novo. Terei a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida em relação aos procedimentos, benefícios e outros assuntos relacionados com a investigação, tendo disponíveis para contato os telefones dos pesquisadores Prof^a Sandra Regina Leite Rosa Olbrich - Departamento de Enfermagem (14) 38116070 , Prof Dr Eduardo Bagagli – Departamento de Microbiologia – IB, Prof Dr Jaime Olbrich Neto – Departamento de Pediatria (14) 38116274. Os resultados deste estudo poderão ser apresentados em reuniões científicas e, ou, publicados em revistas médicas, sendo respeitado o caráter confidencial das informações fornecidas bem como dos resultados individuais da análise laboratorial, não sendo permitida a identificação da criança acima citada ou de seu responsável. Este documento foi aprovado pelo CEP em 04/12/2006 e foi elaborado em duas vias, sendo uma para o participante do projeto e a segunda via arquivo da pesquisadora

Botucatu _____ de _____ de 200_

Responsável pelo paciente_____
Pesquisador

Sandra Regina leite Rosa Olbrich
Rua : Maria Joana Felix Diniz, 1624
Tel: 3882-5602 email :olbrich@fmb.unesp.br

Anexo 3



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 04 de dezembro de 2.006

OF.601/2006-CEP

*Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Eduardo Bagagli
Departamento de Micro-Imuno do
Instituto de Biociências de Botucatu*

Prezado Dr. Bagagli,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP informo que o Projeto de Pesquisa "Estudo da prevalência de fungos em travesseiros de crianças com rinite e, ou, asma", a ser conduzido pela Profª Sandra Regina Leite Rosa Olbrich, orientada por Vossa Senhoria, e Co-orientada pelo Prof. Dr. Jaime Olbrich Neto, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 04/12/2006.

Situação do Projeto: APROVADO:

- Ao término deste projeto, apresentar ao CEP Relatório Final de Atividades.*

Atenciosamente,

*Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP.*

Anexo 4

Manuscript to be submitted: *Pediatric Allergy and Immunology (Official Journal of the European Academy of Allergy and Clinical Immunology)*
