

AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO A FUNGOS E PARTÍCULAS EM  
EXPLORAÇÕES AVÍCOLAS E SUINÍCOLAS: Estudo

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA - ESTeSL

**Nº2/2009**

## **Catálogo Recomendada**

Avaliação da exposição a fungos e partículas em explorações avícolas e suinícolas/Escola Superior das Tecnologias da Saúde de Lisboa, coord. Carlos Silva Santos, Carla Viegas. Lisboa: ACT, 2015. - 62 p.;25cm

Efeitos biológicos/Exposição/Avaliação da Exposição/Avaliação do Risco/Riscos Profissionais/Doenças Profissionais/Estudos/Pecuária/Aviários/Portugal

### Equipa de projeto:

Doutor Carlos Silva Santos - ENSP  
Doutora Carla Viegas - ESTeSL  
Mestre Ana Almeida - ESTeSL  
Mestre Anália Clérigo - ESTeSL  
Mestre Cristina Veríssimo - INSA  
Doutora Elisabete Carolino - ESTeSL  
Mestre Hermínia Dias - ESTeSL  
Doutora Joana Malta-Vacas - ESTeSL  
Doutora Luisa Veiga - ESTeSL  
Dra. Marina Almeida-Silva - CTN/IST  
Doutora Raquel Sabino - INSA  
Doutora Susana Viegas - ESTeSL  
Mestre Vanessa Mateus - ESTeSL

### EDITOR

ACT - Autoridade para as Condições do Trabalho  
Lisboa, fevereiro de 2015

As informações contidas nesta publicação são da responsabilidade dos autores e não refletem necessariamente a posição ou a opinião da ACT



**Estudo resultante do Projeto nº 049APJ/09**

**Avaliação da exposição a fungos e partículas em  
explorações avícolas e suinícolas**

**Entidade Proponente**

Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL)

*“Esta publicação, com o trabalho que descreve, foi, em parte, financiada pela Autoridade para as Condições do Trabalho (ACT). O seu conteúdo, incluindo quaisquer opiniões e/ou conclusões expressas, é da responsabilidade dos seus autores e não reflete necessariamente a política e a posição da ACT.”*

### **Agradecimentos**

- Dra. Maria da Luz Antunes pela colaboração preciosa na pesquisa bibliográfica inerente ao estudo e à produção científica resultante.
- Dra. Ana Lúcia Pereira pela colaboração na edição do documentado apresentado.

## ÍNDICE

Agradecimentos:.....	3
1. Introdução .....	9
1.1. Descrição do projeto.....	11
1.2. Objetivos.....	12
2. Materiais e métodos .....	12
2.1. Descrição do projeto.....	12
2.2. Programação das atividades desenvolvidas .....	13
2.3. Caracterização das explorações avícolas e suínicas analisadas .....	14
2.4. Amostragem ambiental.....	15
2.4.1. Pesquisa da contaminação fúngica através dos métodos convencionais .....	15
2.4.2. Pesquisa da contaminação fúngica através da biologia molecular.....	16
2.4.3. Avaliação ambiental da contaminação por partículas.....	17
2.5. Amostragem biológica .....	18
2.5.1. Parâmetros espirométricos.....	18
2.5.2. Dados clínicos e epidemiológicos.....	18
2.5.3. Sensibilização aos agentes fúngicos (ige).....	19
2.5.4. Indicador biológico de exposição à aflatoxina B <sub>1</sub> .....	19
2.6. Análise estatística.....	20
3. Resultados .....	20
3.1. Frequência das espécies fúngicas e a sua distribuição no ar e superfícies nos dois contextos profissionais.....	21
3.1.1. Explorações avícolas.....	21
3.1.2. Explorações suínicas.....	23
3.2. Variáveis ambientais que influenciam a exposição a fungos e a partículas .....	24
3.2.1. Explorações avícolas.....	24
3.2.2. Explorações suínicas.....	26
3.3. Influência das partículas na dispersão fúngica nos dois contextos profissionais .....	28
3.3.1. Explorações avícolas.....	28
3.3.2. Explorações suínicas.....	28
3.4. Pontos críticos referentes à exposição a fungos e partículas nos dois contextos profissionais.....	30
3.4.1. Explorações avícolas.....	30
3.4.2. Explorações suínicas.....	30

3.5.	Alterações da função respiratória, reações alérgicas adquiridas e sensibilização aos agentes fúngicos dos trabalhadores expostos .....	31
3.5.1.	Parâmetros espirométricos .....	31
3.5.2.	Dados clínicos e epidemiológicos .....	31
3.5.3.	Sensibilização aos agentes fúngicos (ige) .....	32
3.6.	Pesquisa de três espécies/estirpes potencialmente patogénicas/toxinogénicas com recurso à biologia molecular .....	32
3.6.1.	Estirpes toxinogénicas do complexo <i>a. Flavus</i> .....	32
3.6.2.	Complexo <i>aspergillus fumigatus</i> .....	32
3.6.3.	<i>Stachybotrys chartarum</i> .....	33
3.7.	Avaliação da exposição dos trabalhadores à micotoxina aflatoxina b1 .....	33
3.7.1.	Explorações avícolas .....	33
3.7.2.	Explorações suínolas .....	33
4.	Discussão .....	33
4.1.	Frequência das espécies fúngicas e a sua distribuição no ar e superfícies nos dois contextos profissionais .....	33
4.1.1.	Explorações avícolas .....	33
4.1.2.	Explorações suínolas .....	34
4.2.	Variáveis ambientais que influenciam a exposição a fungos e a partículas .....	35
4.2.1.	Explorações avícolas .....	35
4.2.2.	Explorações suínolas .....	36
4.3.	Influência das partículas na dispersão fúngica nos dois contextos profissionais .....	36
4.3.1.	Explorações avícolas .....	36
4.3.2.	Explorações suínolas .....	36
4.4.	Pontos críticos referentes à exposição a fungos e partículas nos dois contextos profissionais .....	37
4.4.1.	Explorações avícolas .....	37
4.4.2.	Explorações suínolas .....	37
4.5.	Alterações da função respiratória, reações alérgicas e a sensibilização aos agentes fúngicos dos trabalhadores expostos .....	37
4.5.1.	Parâmetros espirométricos .....	38
4.5.1.1.	Explorações avícolas .....	38
4.5.1.2.	Explorações suínolas .....	38
4.5.2.	Dados clínicos e epidemiológicos .....	38
4.5.3.	Sensibilização aos agentes fúngicos (ige) .....	39
4.6.	Aferir a existência de 3 espécies/estirpes potencialmente patogénicas/toxinogénicas com recurso à biologia molecular .....	39
4.7.	Avaliação da exposição dos trabalhadores aflatoxina b1 .....	41
4.7.1.	Explorações avícolas .....	41
4.7.2.	Explorações suínolas .....	42

---

4.8. Identificação das medidas ambientais preventivas para eliminar/controlar a exposição aos dois fatores de risco .....	42
5. Conclusões e perspectivas futuras.....	44
6. Referências bibliográficas .....	46
Resumo .....	56
Résumé .....	58
Abstract.....	60
7. Apêndices.....	62
7.1. Apêndice 1 - questionário european community respiratory health survey .....	62
7.2. Apêndice 2 - termo de consentimento informado .....	62
7.3. Apêndice 3 – fotos alusivas ao estudo .....	62
7.4. Apêndice 4 – listagem da produção científica decorrente do estudo .....	62
7.4.1. Comunicações orais .....	62
7.4.2. Publicações em actas de congresso .....	62
7.4.3. Publicações em livros .....	62
7.4.4. Publicações em revistas científicas .....	62
7.4.5. Posters científicos.....	62

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Sequência de primers e TaqMan probes e condições das reacções utilizadas no PCR TR .....	17
<b>Tabela 2.</b>	Colheitas e medições ambientais realizadas.....	17
<b>Tabela 3.</b>	Quantificação da carga fúngica presente no ar das 7 explorações avícolas .....	21
<b>Tabela 4.</b>	Fungos mais frequentes isolados no ar das explorações avícolas.....	21
<b>Tabela 5.</b>	Géneros mais frequentes na cama nova e cama usada .....	22
<b>Tabela 6.</b>	Espécies fúngicas mais frequentes no ar das explorações suínicas .....	23
<b>Tabela 7.</b>	Valores da mediana, percentis de 25 e 75% e intervalo interquartil da contaminação fúngica por cada tipo de cama .....	25
<b>Tabela 8.</b>	Relação da carga fúngica (UFC/m <sup>3</sup> ) com as variáveis ambientais analisadas (Correlação de Pearson) .....	26
<b>Tabela 9.</b>	Valores da mediana para a concentração das partículas em cada dimensão.....	28
<b>Tabela 10.</b>	Medições das partículas obtidas em cada exploração suínica (média/mg.m <sup>-3</sup> ) .....	29
<b>Tabela 11.</b>	Medidas preventivas a adotar no ambiente das explorações avícolas.....	42
<b>Tabela 12.</b>	Medidas preventivas a adotar no ambiente das explorações suínicas .....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Equipamento utilizado para as colheitas de ar através do método impacto e para aplicar os métodos convencionais (Millipore Air Tester).....	15
<b>Figura 2.</b>	Equipamento utilizado para as colheitas de ar através do método impinger e para aplicar biologia molecular (Coriolis u) .....	16
<b>Figura 3.</b>	Incidência do género <i>Aspergillus</i> na cama nova e na cama usada.....	23
<b>Figura 4.</b>	Correlação entre a temperatura e a carga fúngica no ar.....	24
<b>Figura 5.</b>	Correlação entre a contaminação fúngica (UFC/g) e a idade da cama.....	25
<b>Figura 6.</b>	Correlação entre contaminação fúngica do ar (UFC/m <sup>3</sup> ) e contaminação fúngica da cama (UFC/g).....	26
<b>Figura 7.</b>	Contribuição da humidade relativa na explicação da variação das PM1 .....	27
<b>Figura 8.</b>	Correlação da contaminação fúngica das superfícies (UFC/m <sup>2</sup> ) e a contaminação fúngica do ar (UFC/m <sup>3</sup> ) .....	27
<b>Figura 9.</b>	a) Distribuição das partículas por granulometrias nos diferentes locais das explorações.....	29
	b) Distribuição das PM1 <sub>0</sub> nos diferentes locais das explorações.....	29

## 1. Introdução

A presença de fungos requer condições específicas de temperatura, humidade, oxigénio e nutrientes. As atividades biológicas de biodegradação e biodeterioração dos fungos dependem da atividade enzimática, das condições ambientais, do fenómeno de competição entre espécies e, ainda, da natureza do substrato onde os fungos se encontram (Goyer et al., 2001).

Em situações onde a contaminação fúngica é elevada ou quando os indivíduos expostos sofrem de problemas respiratórios ou possuem um sistema imunológico fragilizado, a exposição pode causar o aparecimento de sintomas e/ou patologias. Os efeitos estão dependentes das espécies presentes, dos produtos metabólicos, da concentração e da duração da exposição e, não menos importante, da suscetibilidade individual (Goyer et al., 2001).

Até ao momento, os estudos epidemiológicos não conseguiram estabelecer uma relação causal entre a extensão da presença de fungos, o tempo de exposição e os efeitos específicos para a saúde ou na frequência e gravidade dos sintomas relatados. Os estudos tendem a evidenciar apenas a existência de uma ligação entre a presença de fungos num determinado ambiente e o desenvolvimento de sintomas, principalmente do foro respiratório (Goyer et al., 2001). No entanto, e de uma forma geral, as espécies fúngicas têm sido identificadas como causa de doenças alérgicas, dores de cabeça, irritação ocular, obstrução das vias respiratórias, tosse e outros sintomas (Daisey et al., 2003).

Acresce, ainda, o facto de algumas estirpes fúngicas de certas espécies fúngicas, como por exemplo *Aspergillus flavus* (Okoth et al., 2012), *Aspergillus fumigatus* (Orciulo et al., 2007) e *Stachybotrys chartarum* (Bhan et al., 2011), poderem produzir metabolitos secundários, como as micotoxinas, em resposta às alterações do local em que se encontram, podendo ser pró-inflamatórias, imunossupressoras e/ou cancerígenas (Speijers et al., 2004; Brera et al., 2002).

No âmbito das micotoxinas e, no que diz respeito a uma das micotoxinas mais estudadas devido ao seu efeito cancerígeno, a Aflatoxina B1, importa avaliar a exposição contemplando as diferentes vias de penetração – a ingestão e, ainda, a inalação para o caso da exposição profissional – para permitir o conhecimento da intensidade da exposição e, desta forma, uma avaliação do risco mais real (Olsen et al., 1988; Autrup et al., 1991; Brera et al., 2002; Liao et al., 2005). A avaliação da exposição a este fator de risco tem sido realizada frequentemente recorrendo a Indicadores Biológicos de Exposição (dose), mais concretamente através da quantificação na urina do aducto de proteína AFB1-N7-guanina. Embora não permitindo diferenciar a via de penetração, apresenta-se como um instrumento mais exato para a avaliação da exposição (Groopman et al., 1992; Nayak et al., 2001; Groopman et al., 2005).

Relativamente às partículas (ou matéria particulada), torna-se pertinente caracterizar a sua concentração devido a vários factores designadamente: serve de indicador de contaminação ambiental, pode implicar diretamente efeitos para a saúde e, ainda, pelo facto de servirem de veículos de dispersão de diversas espécies fúngicas (Kim, Park, Kim e Lee, 2006) e dos seus metabolitos, como as micotoxinas (Flannigan and Gillian 1996; Brera et al., 2002).

A contaminação por fungos e pelos seus respetivos metabolitos nos ambientes ocupacionais é um dos principais factores que podem afectar a saúde dos trabalhadores. Por esse motivo, a criação de medidas

que visem a limitação da disseminação dos fungos nos diferentes “settings” profissionais, é essencial e deverá ser considerada como uma das prioridades da comunidade científica (Lugauskas, Krikstaponis e Sveistyte, 2004).

Os principais objetivos da avaliação da exposição (ação desenvolvida neste estudo) são a determinação da fonte do factor de risco, do tipo de exposição, da intensidade dessa exposição e do respectivo tempo de exposição permitindo, posteriormente, definir a aceitabilidade ou inaceitabilidade do risco (Uva, 2006).

As atividades agrícolas, como a produção animal, aumentam o risco de exposição a partículas e a microrganismos, como os fungos (Molocznick et al., 2002; Lues et al., 2007). Em Portugal, e segundo dados facultados pelo Ministério da Agricultura em 2009 (não editados), verifica-se o aumento da indústria da produção de aves para consumo humano. Embora diversa pesquisa tenha sido desenvolvida sobre os possíveis contaminantes microbiológicos na produção de carne para consumo (Buys et al., 2000; Borch et al., 2002), poucos estudos descrevem a possível contaminação do ar interior das instalações (Lues et al., 2007; Whyte et al., 2001). Adicionalmente, além da potencial exposição ocupacional a fungos que ocorre neste contexto ocupacional, a exposição a micotoxinas por via inalatória tem vindo a ser considerada, em vários estudos, como um fator de risco profissional (Olsen et al., 1988; Autrup et al., 1991; Brera et al., 2002).

Em 2010 foi realizado estudo exploratório com o intuito de obtenção de dados e de modo a confirmar se as referências bibliográficas internacionais se aproximavam da realidade portuguesa (Viegas et al., 2011 a). Foi possível caracterizar a distribuição fúngica no ar e superfícies de uma exploração avícola e, ainda, analisar a influência das variáveis ambientais. Com o estudo verificou-se que a situação existente deveria ser considerada como um potencial problema de Saúde Pública, não apenas devido à contaminação fúngica, mas também à possível presença de micotoxinas e à consequente contaminação dos produtos alimentares. Constatou-se, também, um potencial problema de Saúde Ocupacional pela exposição dos trabalhadores aos fatores de risco de natureza biológica e química presentes, designadamente a presença de *Aspergillus fumigatus* no ar e superfícies e a possível exposição a micotoxinas (em particular, a aflatoxina B1), respectivamente (Viegas et al., 2011 a).

Face ao exposto, considerou-se pertinente conhecer as situações de risco a que estão expostos os trabalhadores das explorações avícolas e suínicas, através da identificação dos agentes etiológicos presentes (espécies fúngicas e partículas), das patologias que podem originar (p.e. alterações da função respiratória), da descrição do meio onde se encontram os agentes (explorações analisadas) e, ainda, da caracterização demográfica dos trabalhadores presentes nestes settings.

### 1.1. Descrição do projeto

O estudo em causa contou com a colaboração técnica e científica de vários intervenientes, de modo a assegurar a qualidade e análise dos dados obtidos. A equipa sofreu algumas evoluções do que inicialmente foi proposto, por ter havido necessidade de alterar alguns dos objetivos propostos e, pelo próprio estudo, ter permitido identificar outros temas de real pertinência a serem desenvolvidos.

Elementos intervenientes	Instituição	Funções
Doutor Carlos Silva Santos	ENSP	Coordenação
Doutora Carla Viegas	ESTeSL	Coordenação, colheitas ambientais e análise da identificação fúngica
Mestre Ana Almeida	ESTeSL	Colheitas biológicas - Soro
Mestre Anália Clérigo	ESTeSL	Colheitas biológicas – Espirometrias
Mestre Cristina Veríssimo	INSA – Laboratório de Micologia	Colheitas biológicas – Sensibilização aos agentes fúngicos
Doutora Elisabete Carolino	ESTeSL	Análise estatística dos dados
Mestre Hermínia Dias	ESTeSL	Colheitas biológicas – Espirometrias
Doutora Joana Malta-Vacas	ESTeSL	Colheitas ambientais – Biologia molecular
Doutora Luísa Veiga	ESTeSL	Processamento laboratorial (IBE – AFB1)
Dra. Marina Almeida-Silva	CTN/IST	Análise estatística dos dados respeitantes às partículas
Doutora Raquel Sabino	INSA – Laboratório de Micologia	Colheitas ambientais – Identificação fúngica e análise da informação
Doutora Susana Viegas	ESTeSL	Avaliações ambientais da matéria particulada nos dois settings. Análise crítica dos dados obtidos. Avaliação da exposição a aflatoxina B1 por recurso a indicador biológico da exposição.
Mestre Vanessa Mateus	ESTeSL	Dados clínicos e epidemiológicos sobre a existência de sintomas clínicos associados com a asma e outras doenças alérgicas

## 1.2. Objetivos

O estudo que se propôs pretendeu contribuir para o conhecimento do risco de exposição a fungos e partículas das explorações avícolas e suínolas e os eventuais efeitos sobre a saúde.

Neste contexto, definiram-se como objetivos específicos:

- Conhecer a frequência das espécies fúngicas e a sua distribuição no ar e superfícies nos dois contextos profissionais;
- Descrever a exposição ambiental a fungos e partículas; Identificar as variáveis ambientais que influenciam a exposição a estes dois factores de risco;
- Conhecer a influência das partículas na dispersão fúngica nos dois contextos profissionais;
- Identificar os pontos críticos nas diversas atividades decorrentes dos dois contextos profissionais;
- Conhecer alterações da função respiratória e/ou as reações alérgicas adquiridas pelos trabalhadores expostos e, ainda, a sensibilização aos agentes fúngicos;
- Identificar medidas ambientais preventivas para eliminar/controlar a exposição a estes dois factores de risco.

Após a análise dos resultados obtidos decorrentes da exposição ambiental a fungos e partículas, foram adicionados mais dois objetivos que visavam o alcance do objetivo geral do estudo. Ambos os objetivos não foram abrangidos pelo financiamento obtido pela Autoridade das Condições de Trabalho (ACT), no entanto eram essenciais para a avaliação completa da exposição a fungos e para a compreensão dos eventuais efeitos sobre a saúde dos trabalhadores. Assim, foram acrescentados os seguintes objetivos:

- Aferir a existência de 3 espécies/estirpes potencialmente patogénicas/toxinogénicas com recurso à biologia molecular, de modo a complementar os métodos convencionais para a caracterização da contaminação fúngica (apenas em 5 explorações avícolas por insuficientes recursos);
- Avaliação da exposição dos trabalhadores à micotoxina aflatoxina B1 por recurso a indicador biológico de exposição.

Ambos os objetivos adicionados ao estudo foram suportados financeiramente em parte pela ESTeSL e, ainda, por recursos próprios dos investigadores envolvidos no estudo.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Descrição do projeto

O processo de investigação comporta duas fases principais: a fase conceptual e a fase metodológica ou empírica. Na fase conceptual, ou enquadramento teórico, realizou-se a escolha e formulação do problema de investigação, efectuando-se uma revisão da literatura internacional existente. Já tinha sido realizado um estudo exploratório numa exploração avícola que corroborou a pertinência do estudo (Viegas et al., 2011 a), facilitando igualmente a posterior pesquisa bibliográfica e a definição de objetivos concretos.

Na fase metodológica, foram enunciados os objetivos, geral e específicos, as respectivas questões de investigação, definiu-se ainda a população que se iria tratar e, conseqüentemente, a amostra a considerar.

Foram ainda determinados os métodos de recolha de dados, essenciais para obter as respostas às questões de investigação (Fortin, 2003). Ainda na fase metodológica, realizou-se a colheita de dados no terreno, optando-se pela recolha de material biológico aos trabalhadores, na avaliação ambiental da contaminação fúngica e avaliação da exposição a partículas. Os trabalhadores responderam a um questionário, de modo a conhecer algumas das variáveis individuais e profissionais com pertinência para o presente estudo. De seguida, procedeu-se à organização e respectivo tratamento estatístico dos dados recolhidos.

A amostra de estabelecimentos foi constituída por 7 explorações avícolas e 7 explorações suínicas, com maior número de trabalhadores, situadas no distrito de Lisboa, sendo por isso uma amostra não aleatória de conveniência (Fortin, 2003). Em relação à amostra de trabalhadores foi constituída por 47 trabalhadores de explorações avícolas e 33 de explorações suínicas com idades dos 17 aos 71 anos.

Apenas foi possível abranger 7 explorações de cada setting, devido à diferença entre o financiamento solicitado e o obtido.

## 2.2. Programação das atividades desenvolvidas

O estudo em causa teve a duração de 3 anos e as atividades inerentes ao mesmo tiveram a distribuição que se segue.

### FASE 1: 2011 (1º semestre)

Neste período foram realizadas, de acordo com o previsto, as seguintes atividades:

- Pesquisa e análise bibliográfica inerente à realização do estudo. Para o efeito foram analisados, aproximadamente, 300 artigos sobre exposição a fungos e partículas nos dois *settings* selecionados;
- Reunião com o Ministério da Agricultura e veterinários responsáveis pelas explorações alvo do estudo;
- Compilação dos meios materiais (consumíveis de laboratório, bisturis, pinças, zaragatoas, meios...) e equipamento (coletor de ar) necessários para as atividades subsequentes;
- Realização de 28 amostras ambientais do ar, 20 amostras de superfícies e 21 amostras de cama em 7 explorações avícolas e 56 amostras ambientais de ar, 48 amostras de superfícies e 7 amostras de cobertura de pavimento em 7 explorações suínicas;
- Realização de 80 espirometrias e colheita de amostras de sangue aos trabalhadores dos dois settings profissionais;
- Elaboração e distribuição de questionário aos trabalhadores de modo a aferir a sintomatologia, a prevalência de asma e, ainda, para obter informação referente a variáveis pertinentes para o estudo;
- Processamento laboratorial de todas as amostras ambientais realizadas.

### FASE 1: 2011 (2º semestre)

- Recolha de material bibliográfico acerca da exposição profissional a micotoxinas;

- Contacto com investigadores internacionais de modo a obter bibliografia adicional (Center for Working Environment and Human Factors (lfado) e l'Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles (INRS);
- Pesquisa sobre o indicador biológico de exposição mais adequado e possível de utilizar no material biológico que detinhamos;
- Definição do método e validação do mesmo;
- Solicitação de apoio financeiro (consumíveis) ao fornecedor dos Kits próprios para medir Aflatoxina B1.
- Recolha de material biológico a 30 controlos;
- Doseamento de Aflatoxina B1 a trabalhadores (n=59: 31 dos aviários e 28 das suínicas) e controlos (n=30).

#### **FASE 2: 2012 (1º semestre)**

Nesta fase realizou-se a análise estatística dos resultados obtidos, de modo a dar resposta aos objetivos propostos.

#### **FASE 3: 2012 (2º semestre)**

Após compilação e análise da informação obtida nas fases anteriores, realizou-se relatório final sobre a temática em estudo.

### **2.3. Caracterização das explorações avícolas e suínicas analisadas**

As sete explorações avícolas estudadas foram seleccionadas pelo fato de possuírem maior número de trabalhadores. As mesmas eram constituídas por pavilhões com um único propósito de acondicionar as aves em ambiente fechado, de modo a potenciar o seu crescimento rápido para abate. As atividades diárias realizadas pelos trabalhadores são diversas, como por exemplo: observar frequentemente o estado das aves, manter cheios os bebedouros e comedouros, administrar vacinas, adicionar ou revirar a cama, entre outras. Em alguns casos, os mesmos trabalhadores também capturavam e transportavam as aves para o matadouro e, ainda, transportavam a cama usada para os campos onde seria utilizada como fertilizante. Os pavilhões têm ventilação natural e mecânica, mas o último é geralmente ativado somente no verão, quando a temperatura e a humidade aumentam. Importa referir que os trabalhadores não tinham à sua disposição equipamentos de protecção individual e que, por serem pequenas empresas familiares, a sua exposição era contínua, pois trabalhavam também ao fim de semana.

No caso das explorações suínicas, estas foram seleccionadas por terem o maior número de trabalhadores e o maior número de animais. As explorações possuíam espaços diferenciados designadamente: gestação, maternidade, engorda, quarentena, local onde estão acondicionados os machos e armazém. Cinco explorações possuíam além da ventilação natural (janelas com cortina plástica), ventilação mecânica (exaustão). Os trabalhadores possuíam farda de trabalho, mas não utilizavam equipamentos de protecção individual. O horário mais comum, praticado pelos trabalhadores, era de 8 horas por dia nos dias úteis e mais 8 horas durante um dia de fim de semana.

## 2.4. Amostragem ambiental

### 2.4.1. Pesquisa da contaminação fúngica através dos métodos convencionais

Foram colhidas 28 amostras de ar de 25 litros nas explorações avícolas e 56 amostras de 50 litros nas explorações suínolas através do método de impacto em malte de extract agar (2%) com cloranfenicol (0.05 g/L) e a 1 metro de altura (Figura 1). As colheitas de ar também foram realizadas no exterior dos pavilhões, pois foi considerado como local de referência (Sabino et al., 2012). Importa referir que os litros das amostras de ar foram seleccionados com base na contaminação prevista e de modo a viabilizar o processamento laboratorial subsequente. Simultaneamente, a temperatura e a humidade relativa também foram registadas.



**Figura 1.** Equipamento utilizado para as colheitas de ar através do método impacto e para aplicar os métodos convencionais (Millipore Air Tester)

As colheitas das superfícies foram realizadas através da técnica de zaragatoa, nos mesmos locais onde foram colhidas as colheitas de ar interior, tendo sido utilizado um quadrado de metal inoxidável de 10 cm de lado desinfectando com álcool a 70% entre colheitas, de acordo com a International Standard ISO 18593 – 2004. As zaragatoas obtidas (20 das explorações avícolas e 48 das explorações suínolas) foram inoculadas em malte de extract agar (2%) com cloranfenicol (0.05 g/L) (MEA) (Sabino et al., 2012).

Além das colheitas de ar e de superfícies, foram também obtidas colheitas da cama das explorações avícolas (7 novas e 14 usadas) e da cobertura do pavimento das explorações suínolas (3 novas e 4 usadas) e embaladas em sacos esterilizados. Cada amostra foi diluída e inoculada em placas contendo MEA (Viegas et al., 2012 a).

Todas as amostras foram incubadas a 27.5°C durante 5 a 7 dias e obtidos resultados quantitativos (UFC/m<sup>3</sup>; UFC/m<sup>2</sup>; UFC/g) e qualitativos com a identificação das espécies fúngicas, sempre que possível até ao nível da espécie.

#### 2.4.2. Pesquisa da contaminação fúngica através da biologia molecular

Foram realizadas colheitas de ar de 300 litros utilizando o método de impinger com a velocidade de recolha de 300 L/min (Figura 2). As colheitas foram realizadas para copos esterilizados contendo solução salina (PBS) com 0.05% Tritin X-100, sendo este líquido, posteriormente, utilizado para a extração de DNA utilizando para o efeito o kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep Kit (Zymo Research), de acordo com as instruções do fabricante (Malta-Vacas et al., 2012).



**Figura 2.** Equipamento utilizado para as colheitas de ar através do método impinger e para aplicar biologia molecular (Coriolis u)

A identificação molecular de três espécies potencialmente patogénicas e/ou toxinogénicas (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* e *Stachybotrys chartarum*) foram obtidas por PCR em tempo real (PCR TR) utilizando o Rotor-Gene 6000 qPCR Detection System (Corbett). Reações incluíram 1X iQ Supermix (Bio-Rad), e primers específicos e Taqman probes para cada espécie (Tabela 1) num volume total de 20 µl. A amplificação seguiu 3 etapas no PCR: 40 ciclos com temperatura de desnaturação a 95 °C durante 30 seg., e temperatura de hibridização (*Annealing - Ann*) por 30 seg. com extensão a 72 °C durante 30 seg.. Foi utilizado contro negativo em cada reacção de PCR e um controlo positivo para cada espécie com amostras de DNA de estirpes de referência cedidas pelo laboratório Micologia do Instituto Nacional Doutor Ricardo Jorge (INSA).

**Tabela 1.** Sequência de primers e TaqMan probes e condições das reacções utilizadas no PCR TR

	Sequências	Condições das reacções	
		Concentração ( $\mu$ M)	Ann T ( $^{\circ}$ C)
<i>A. flavus</i> (Mayer et al., 2003)	F: GTCCAAGCAACAGGCCAAGT	0.5	53
	R: TCGTGCATGTTGGTGATGGT	0.5	
	P: FAM-TGTCTTGATCGGCGCCCG-TAMRA	0.375	
<i>A. fumigatus</i> (Cruz-Perez et al., 2001a)	F: CGCGTCCGGTCCTCG	0.375	52
	R: TTAGAAAAATAAGTTGGGTGTCGG	0.375	
	P: FAM-TGTCACCTGCTCTGTAGGCCCG-TAMRA	0.375	
<i>S. chartarum</i> (Cruz-Perez et al., 2001b)	F: GTTGCTTCGGCGGGAAC	0.15	60
	R: TTTGCGTTTGCCACTCAGAG	0.15	
	P: FAM-CTGCGCCCGGATCCAGGC-TAMRA	0.1	

### 2.4.3. Avaliação ambiental da contaminação por partículas

As medições foram realizadas por recurso a equipamento de leitura direta (modelo Lighthouse, 2016 IAQ). Este recurso permitiu medir a concentração ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ) de partículas em 5 dimensões distintas (PM<sub>0,5</sub>; PM<sub>1,0</sub>; PM<sub>2,5</sub>; PM<sub>5,0</sub>; PM<sub>10</sub>). A escolha por este recurso deveu-se ao facto de esta informação permitir estimar a capacidade de penetração das partículas no aparelho respiratório dos indivíduos expostos. De modo mais detalhado o equipamento em questão permite diferenciar as partículas inaláveis (PM<sub>5</sub> e PM<sub>10</sub>) e respiráveis (PM<sub>0,5</sub>; PM<sub>1</sub> e PM<sub>2.5</sub>) (Brunekreef and Forsberg, 2005).

As medições foram realizadas junto do aparelho respiratório e durante o desenrolar das atividades.

Na tabela seguinte apresenta-se resumo das colheitas e avaliações ambientais realizadas nas explorações avícolas e suinícolas analisadas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Colheitas e medições ambientais realizadas

Explorações	Métodos convencionais			Biologia molecular	Partículas
	Colheitas de ar	Colheitas de superfícies	Colheitas de cama/revestimento	Colheitas de ar	
<b>Avícolas</b>	28	20	7 nova; 14 usada	18	34
<b>Suinícolas</b>	56	48	3 nova; 4 usada	-	50

Adopted from (Viegas et al., 2013 a) in press e (Viegas et al., 2013 b)

## 2.5. Amostragem biológica

### 2.5.1. Parâmetros espirométricos

Foram medidos os parâmetros espirométricos utilizando o espirómetro MK8 Microlab, que foi sempre calibrado antes de cada sessão de recolha de dados como uma seringa de 3 L. O espirómetro utilizado cumpria com os *standards* internacionais relativamente ao débito e à duração do teste. Foram realizados pelo menos três testes aceitáveis e a reprodutibilidade foi verificada nos dois testes com a maior capacidade vital forçada (FVC) e o maior volume expiratório máximo no 1º segundo (FEV1), de acordo com as orientações da ATS/ERS, 2005 (Miller et al., 2005). Os parâmetros funcionais respiratórios que foram avaliados incluíram: a FVC, o FEV1, a relação FEV1/FVC%, os débitos máximos a diferentes volumes da FVC (FEF 25, FEF50; FEF75, e FEF25-75).

Não foi avaliado um grupo de controlo, pois o objetivo era estudar a prevalência de alterações funcionais em trabalhadores expostos. Por esse motivo, foi considerada adequada a metodologia normalmente utilizada nos laboratórios de função respiratória. Assim, os resultados foram comparados com valores de referência da Comunidade Europeia do Carvão e do Aço (CECA) (Quanjer et al., 1993). Para a interpretação dos resultados foi usado o ponto de corte fixo de 80.0%. As alterações funcionais respiratórias foram classificadas de acordo com os seguintes critérios: (1) obstrutiva—FEV1/FVC% inferior a 80%; (2) restritiva—FEV1 e FVC inferior a 80.0% com FEV1/FVC % igual ou superior a 80.0%; e (3) inespecífica—FEV1, FVC, e FEV1/FVC% inferior a 80% ou FEF's inferiores a 60.0%.

As espirometrias foram realizadas numa amostra de 46 trabalhadores de explorações avícolas, 69.6% do género masculino e 30.4% do feminino. Os dados de fumadores e de não fumadores foram analisados separadamente. Foi utilizada a estatística descritiva devido à dimensão reduzida da amostra.

Relativamente às explorações suinícolas, 8 trabalhadores (38.8%) foram excluídos do estudo, pois tinham antecedentes de patologia pulmonar. Assim, foram estudados 18 trabalhadores, dos quais 66.7% eram do género masculino e 33.3% do género feminino.

### 2.5.2. Dados clínicos e epidemiológicos

Foi avaliada a existência de sintomas clínicos associados com a asma e outras doenças alérgicas, através do questionário *European Community Respiratory Health Survey* (ECRHS, 2007 em apêndice). Este questionário permite a avaliação da prevalência de asma e outras doenças alérgicas, a caracterização da existência de sintomatologia respiratória, cutânea e ocular, assim como, a avaliação dos sintomas relacionados com o trabalho.

Foi efetuado um estudo transversal e os dados do questionário foram obtidos sob a forma de entrevista.

Foram avaliados 80 trabalhadores destes dois sectores profissionais, nomeadamente 47 (58.8%) trabalhadores de aviários e 33 (41.2%) de suiniculturas. A idade média dos trabalhadores foi  $42.7 \pm 11.8$  anos, maioritariamente entre os 31 e os 58 anos (76.25%).

### 2.5.3. Sensibilização aos agentes fúngicos (IgE)

Foi colhido soro a 14 mulheres e 33 homens que trabalhavam em explorações avícolas e foi utilizada população controlo (N= 28) seleccionada aleatoriamente de entre um grupo de estudantes e docentes de uma instituição de ensino superior. Optou-se por realizar aos trabalhadores das explorações avícolas, pois não foi possível realizar aos colaboradores de ambos os *settings* por falta de recursos financeiros, tendo sido seleccionado o contexto que apresentava maior carga fúngica.

Para pesquisa da sensibilização foram utilizadas 2 misturas comercializadas pela ImmunoCAP®, Phadia utilizadas para medir anticorpos a IgE específicos: mx2 (*P. notatum*, *C. herbarum*, *A. fumigatus*, *C. albicans*, *Alternaria alternata*, *H. halodes* e mx4 (*A. terreus*, *A. niger*, *A. flavus*). A sensibilização foi definida desde que houvesse, pelo menos, um resultado positivo a um alérgeno fúngico (Veríssimo et al., 2012).

### 2.5.4. Indicador Biológico de Exposição à AFB1

Foram colhidas amostras de sangue num total de 58 trabalhadores (31 doas aviários e 28 das suiniculturas). Foram recolhidas também amostras de sangue de um grupo de controlo constituído por 30 indivíduos sem atividade agrícola. Este grupo de controlo foi utilizado como forma de excluir a exposição por via alimentar do grupo de trabalhadores dado não se conhecer a exposição da população Portuguesa a esta micotoxina (Viegas et al., 2012 b), 2013 c). A todos os elementos que acederam participar no estudo foi apresentado um termo de consentimento informado onde se descrevia de forma sumária o estudo que se pretendia realizar e o compromisso dos investigadores em assegurar a confidencialidade e privacidade dos dados (Termo de Consentimento Informado em apêndice).

A determinação de aflatoxina foi realizada em soro, isolado a partir de sangue total por centrifugação. As amostras foram armazenadas a -20°C para posterior utilização.

A preparação da amostra envolveu uma desproteínização seguida de uma purificação da aflatoxina. Para efetuar a desproteínização, 500 µl de soro foram incubados com pronase durante 18 horas a 37°C (Calbiochem, 50U por 5mg de proteína). O pellet de péptidos formado foi descartado e o sobrenadante resultante foi aplicado numa coluna C18 (RIDAC18, RBiopharm) com o objetivo de remover aminoácidos e pequenos péptidos ainda existentes, a eluição foi realizada utilizando 5ml de metanol 5%. A fração retida contendo aflatoxina foi eluída com metanol a 80%. Esta fração foi ainda concentrada por evaporação até uma concentração aproximada de 10% de metanol.

O eluído contendo a aflatoxina foi posteriormente aplicado numa coluna de imunoafinidade para aflatoxina AFB1 (easi-extract aflatoxin; RBiopharm) com o objetivo de purificar a amostra retirando outras moléculas que de alguma forma pudessem causar interferência na determinação. A fração contendo a aflatoxina foi eluída com 1ml de metanol em tampão fosfato 0.1M, pH 7.4 (1:1).

Para quantificar a AFB1 utilizou-se o kit ELISA (RIDASCREEN Aflatoxin B1 30/15 da RBiopharm). Uma vez que o limite de deteção para esta metodologia específica é de 1ng/ml todos os valores abaixo não foram considerados. Cinco padrões com valores entre 1 e 50ng/ml foram utilizados para elaboração da curva padrão.

O procedimento consistiu em adicionar 50 µl de amostras ou padrões aos poços da placa ELISA. Os poços encontram-se revestidos por anticorpo anti-AFB1. De seguida foram adicionados 100µl de conjugado AFB1-enzima. Estes, aflatoxina livre e aflatoxina conjugada competem para o anticorpo AFB1 ligado aos poços.

Após 30 minutos de incubação a placa foi lavada três vezes para eliminar o conjugado AFB1-enzima não ligado. A cor foi obtida por ligação do substrato/cromagénio ao enzima que origina por reação um produto de cor azul. De forma a permitir que ocorra a reação a solução foi incubada durante 15 minutos. Após os quais se adicionou a solução stop que contém ácido sulfúrico a 1N e converte a cor azul em amarela.

A absorvência é inversamente proporcional à concentração de aflatoxina na amostra e foi medida a 450nm.

## 2.6. Análise estatística

Para o tratamento estatístico dos dados foi utilizado o *software* estatístico SPSS 21.0.

No tratamento estatístico dos dados foram utilizadas as técnicas estatísticas que a seguir se descrevem: análise de frequências, medidas descritivas (médias, medianas, desvios-padrão, intervalos interquartis) e, ainda, representações gráficas adequadas à natureza dos dados.

Com o intuito de obter a comparação de dois grupos independentes, utilizou-se o teste t para amostras independentes (quando o pressuposto de normalidade se verificava) ou o teste de Mann-Whitney (quando era violado o pressuposto de normalidade dos dados).

Para a comparação de  $k > 2$  grupos independentes, utilizou-se a ANOVA a 1 fator (quando o pressuposto de normalidade se verificava) ou o teste Kruskal-Wallis (quando era violado o pressuposto de normalidade dos dados).

Com o objetivo de alcançar a comparação de dois grupos emparelhados, utilizou-se a ANOVA de medições repetidas (quando o pressuposto de normalidade se verificava) ou o teste Friedman (quando era violado o pressuposto de normalidade dos dados).

Com o objetivo de estudar a relação entre duas variáveis quantitativas, utilizou-se a análise de correlação e a análise de regressão linear.

Para o estudo da associação entre duas variáveis qualitativas, utilizou-se o teste Qui-quadrado e sempre que o pressuposto de aplicabilidade não se verificou, utilizou-se o teste Qui-quadrado por simulação de Monte Carlo.

## 3. Resultados

Optou-se por apresentar os resultados tendo em conta os objetivos propostos, sendo que as medidas ambientais preventivas para eliminar/controlar a exposição serão apresentadas no fim da discussão, de modo a considerar os resultados obtidos decorrentes dos dois objetivos propostos adicionalmente e, ainda, a respectiva discussão.

### 3.1. Frequência das espécies fúngicas e a sua distribuição no ar e superfícies nos dois contextos profissionais

#### 3.1.1. Explorações avícolas

Em relação à carga fúngica aerossolizada, presente nas 7 explorações avícolas, o valor mais elevado foi de 24040 UFC/m<sup>3</sup> e o mais baixo foi de 320 UFC/m<sup>3</sup> (Tabela 3).

**Tabela 3.** Quantificação da carga fúngica presente no ar das 7 explorações avícolas

Exploração avícola	N*	Valor mais elevado UFC/m <sup>3</sup>	Valor mais baixo UFC/m <sup>3</sup>	Valor médio UFC/m <sup>3</sup>
A	3	3680	880	1603,3
B	1	4040	4040	4040
C	3	2520	640	1586,6
D	3	1000	320	706,6
E	4	24040	1280	14350
F	3	3600	2000	2540
G	2	8120	2520	5320

\* Número de colheitas

Vinte e oito espécies/gêneros de fungos foram isolados, tendo sido a espécie *Scopulariopsis brevicaulis* (39.0%) a mais comum e *Rhizopus* sp. (30.0%) o género mais frequente (Tabela 4).

**Tabela 4.** Fungos mais frequentes isolados no ar das explorações avícolas

Ar	Frequência (%)
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	40.5
<i>Rhizopus</i> sp.	30.0
<i>Penicillium</i> sp.	10.1
<i>Aspergillus</i> sp.	9.7
Outros	9.7

Em relação à prevalência do género *Aspergillus* nas explorações avícolas, esta foi de 22.2%, tendo sido isoladas 10 espécies diferentes dos 59 pontos de colheita de onde foram obtidos isolados de *Aspergillus*. *Aspergillus versicolor* foi a espécie mais frequente (33.9%), seguida por *A. flavus* (23.7%) e *A. fumigatus* (15.3%). *Aspergillus flavus* apresentou o maior número de esporos (>2000 UFC/m<sup>3</sup>). Entre o género *Aspergillus*, 13 espécies foram isoladas, sendo *A. versicolor* a mais frequente (78.5%), seguida por *A. fumigatus* (4.0%) e *A. ustus* (6.4%). Outras espécies foram também isoladas, nomeadamente: *A. terreus*, *A.*

*candidus*, *A. flavus*, *A. niveus*, *A. niger*, *A. clavatus*, *A. ochraceus*, *A. sydowii* e *A. glaucus* (Sabino et al. 2012).

Em relação às superfícies, *A. versicolor* (31.4%) foi a espécie mais prevalente, seguida de *A. flavus* (16.5%) e *Fusarium solani* (15.3%).

Na cama das explorações avícolas, 12 espécies fúngicas foram isoladas na cama nova, num total de 805500 isolados. *Penicillium* foi o género mais frequente (59.9%), seguido por *Alternaria* (17.8%), *Cladosporium* (7.1%) e *Aspergillus* (5.7%). Além destes, outros géneros foram também isolados, nomeadamente: *Scedosporium* sp., *Paecilomyces* sp., *Absidia* sp., *Rhizopus* sp., *Hormographiella* sp., *Exophiala* sp., *Fusarium* sp. e *Syncephalastrum* sp. (Tabela 4).

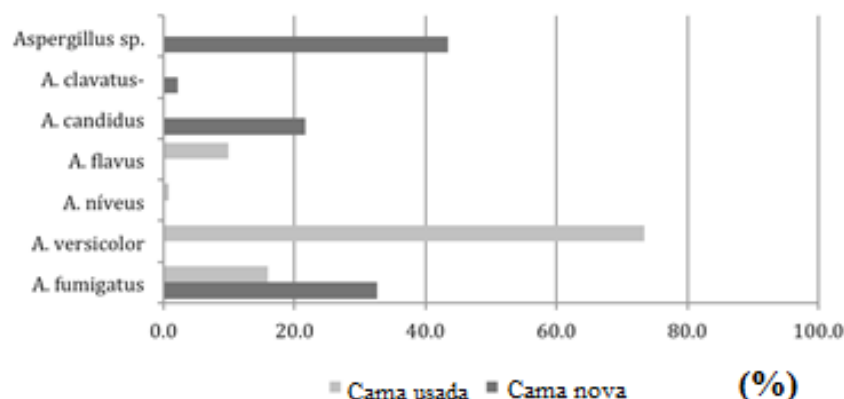
Em relação à cama usada, 19 espécies diferentes foram observadas, num total de 2276500 isolados. *Penicillium* sp. foi o mais frequente (42.3%), seguido por *Scopulariopsis* sp. (38.3%), *Trichosporon* sp. (8.8%) e *Aspergillus* sp. (5.5%). Além destes, foram isolados outros: *Acremonium* sp., *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp., *Arthrinium* sp., *Absidia* sp., *Phoma* sp., *Paecilomyces* sp. e *Syncephalastrum* sp. (Tabela 5). *Scopulariopsis brevicaulis* (81.5%) foi a espécie mais isolada do género *Scopulariopsis* (Viegas et al., 2012 a).

**Tabela 5.** Géneros mais frequentes na cama nova e cama usada

Fungos – Cama nova	Frequência (%)
<i>Penicillium</i> sp.	59.9
<i>Alternaria</i> sp.	17.8
<i>Cladosporium</i> sp.	7.1
<i>Aspergillus</i> sp.	5.7
Outros	9.5
Fungos – Cama velha	Frequência (%)
<i>Penicillium</i> sp.	42.3
<i>Scopulariopsis</i> sp.	38.3
<i>Trichosporon</i> sp.	8.8
<i>Aspergillus</i> sp.	5.5
Outros	5.1

Em relação à cama nova, *Aspergillus fumigatus* foi a espécie mais frequente (32.6%) em relação ao género *Aspergillus*, tendo *A. flavus* sido também isolado em 9.9% das colheitas. Além destas 2 espécies, e entre o género *Aspergillus*, foram também isolados *A. candidus* e *A. clavatus-nanicus*.

No que concerne à cama usada, *Aspergillus versicolor* foi a mais frequente (73.4%) entre o género *Aspergillus*, mas *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niveus* foram também identificados. Como se pode observar na figura seguinte, as espécies de *Aspergillus* apresentaram diferentes incidências na cama nova e cama usada (Figura 3).



**Figura 3.** Incidência do gênero *Aspergillus* na cama nova e na cama usada

### 3.1.2. Explorações suínolas

No que concerne à carga fúngica presente no ar das explorações suínolas, 46 espécies/gêneros foram identificados no ar, num total de 15370 isolados. *Aspergillus versicolor* foi a espécie mais frequente (20.9%), seguida por *Scopulariopsis brevicaulis* (17.0%) e *Penicillium* sp. (14.1%). Além destes, outros gêneros foram também isolados, designadamente: *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Trichoderma* sp., *Phoma* sp., *Alternaria* sp., *Chrysosporium* sp., *Scytalidium* sp., *Pithomyces* sp., *Acremonium* sp., *Chrysonilia* sp., *Hormographiella* sp., *Ochroconis* sp., *Beuveria* sp., *Botrytis* sp., *Stachybotrys* sp., *Epicoccum* sp., *Absidia* sp., *Staphilotrichum* sp., *Ulocladium* sp., *Stemphillum* sp. e *Rhizopus* sp. (Tabela 6).

*Stachybotrys chartarum* foi apenas isolado na maternidade de uma das explorações.

**Tabela 6.** Espécies fúngicas mais frequentes no ar das explorações suínolas

Ar	Frequência (UFC/m <sup>3</sup> ) (%)
<i>Aspergillus versicolor</i>	20.9
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	17.0
<i>Penicillium</i> sp.	14.1
Outros	48.0

No caso do isolamento do gênero *Aspergillus* nas explorações suínolas, a frequência foi de 14.4%, sendo mais baixa do que nas explorações avícolas. Doze espécies deste gênero foram isoladas nos 62 pontos de colheita onde foi isolado este gênero. Apesar das espécies mais comuns deste gênero serem semelhantes nas explorações avícolas, nas explorações suínolas *A. versicolor* apresentou o maior isolamento no ar (>2000 UFC/m<sup>3</sup>) e a maior prevalência (41.9%), seguida por *A. flavus* e *A. fumigatus* (8.1%). Em relação às

superfícies analisadas, *A. versicolor* foi detetada em maior número ( $>3 \times 10^{-2}$  UFC/m<sup>2</sup>) (Sabino et al., 2012; Viegas et al., 2013 d); Viegas et al., 2013 e).

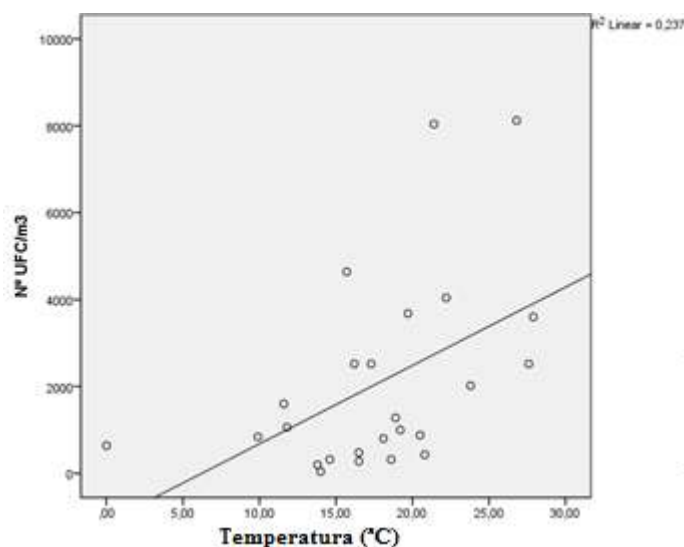
No caso da cobertura do pavimento das explorações suínolas, 8 espécies fúngicas foram isoladas na nova, num total de 35750 isolados e 9 espécies diferentes na usada, num total de 169500 isolados. O género *ThiCODerma* foi o mais frequente na cobertura nova (28.0%) seguida por *A. versicolor* e *Acremonium* sp. (14.0%). Outros géneros foram também isolados, designadamente: *Ulocladium* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Scytalidium* sp. e *Chrysosporium* sp.

O género *Mucor* foi o mais frequente na cobertura usada (25.1%), seguido por *Trichoderma* sp. (18.3%) e *Acremonium* (11.2%). Os outros géneros isolados foram: *Scopulariopsis* sp., *Acremoniella* sp., *Penicillium* sp., *Sepedonium* sp., *Fusarium* sp. e *Geotrichum* sp.

### 3.2. Variáveis ambientais que influenciam a exposição a fungos e a partículas

#### 3.2.1. Explorações avícolas

Nas explorações avícolas foi observada uma correlação positiva ( $r=0.487$ ;  $p=0.014$ ) entre a temperatura e a carga fúngica no ar (UFC/m<sup>3</sup>), demonstrando que o aumento da temperatura provoca o aumento da carga fúngica. A variação da temperatura contribui em 23.7% para a variação das UFC/m<sup>3</sup> (Figura 4).



**Figura 4.** Correlação entre a temperatura e a carga fúngica no ar

Elevados valores de humidade provocam menor contaminação por partículas. No entanto, foi encontrada correlação positiva entre a humidade relativa e algumas dimensões das partículas, designadamente: PM0.5 ( $r=0.438$ ;  $p=0.025$ ) e PM1.0 ( $r=0.537$ ;  $p=0.005$ ), significando que a variação da humidade relativa contribui em 19.2% para a explicação da variação das PM0.5 e 28.8% para a explicação da variação das PM1.0.

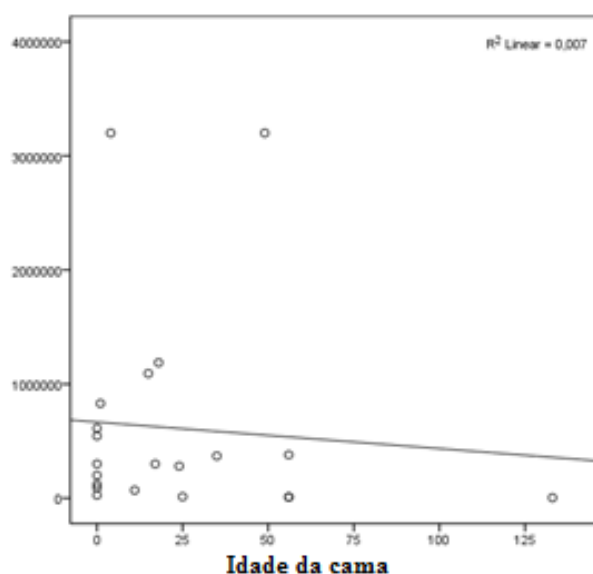
Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas quando comparada a carga fúngica (CFU/g) das diferentes camas ( $H_3=4,798$ ,  $p=0,187$ ). No entanto, foi observada uma tendência para a cama

constituída por aparas de madeira apresentar mais elevados valores de UFC's e para a cama constituída por aparas de madeira e casca de arroz apresentar valores mais baixos (Tabela 8).

**Tabela 7.** Valores da mediana, percentis de 25 e 75% e intervalo interquartil da contaminação fúngica por cada tipo de cama

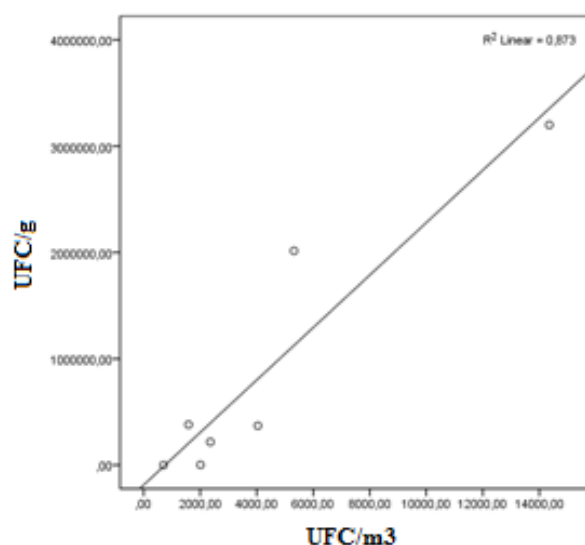
Tipos de cama	Mediana Total UFC/g	25% Perc. Total UFC/g	75% Perc. Total UFC/g	Intervalo Interq. Total UFC/g
Aparas de pinheiro	200500	90000	300000	210000
Palha	285000	113000	1785000	1672000
Aparas de madeira com casca de arroz	156250	9500	818750	809250
Aparas de madeira	830000	612500	3200000	2587500

Correlação entre a contaminação fúngica (UFC/g) e a idade da cama apresentou uma correlação fraca e estatisticamente não significativa ( $r_s = -0,203$ ,  $p = 0,378$ ) (Figura 5).



**Figura 5.** Correlação entre a contaminação fúngica (UFC/g) e a idade da cama

A correlação entre a contaminação fúngica da cama (UFC/g) e a contaminação fúngica do ar (UFC/m<sup>3</sup>) apresentou uma forte correlação positiva e estatisticamente significativa ( $r_s = -0,934$ ,  $p = 0,002$ ), indicando que a contaminação fúngica da cama contribui 87.3% para a explicação da contaminação fúngica do ar (Figura 5).



**Figura 6.** Correlação entre contaminação fúngica do ar (UFC/m<sup>3</sup>) e contaminação fúngica da cama (UFC/g)

### 3.2.2. Explorações suínícolas

Analisou-se a forma e a intensidade da relação da carga fúngica (UFC/m<sup>3</sup>) com a temperatura, humidade relativa e as partículas, tendo sido detectado correlações significativas em sentido positivo entre as UFC/m<sup>3</sup> e a humidade ( $r=0,340$ ,  $p=0,018$ ), PM<sub>2.5</sub>ug/m<sup>3</sup> ( $r=0,490$ ,  $p=0,000$ ), PM<sub>5</sub>ug/m<sup>3</sup> ( $r=0,411$ ,  $p=0,004$ ) e PM<sub>10</sub>ug/m<sup>3</sup> ( $r=0,347$ ,  $p=0,016$ ). Consta-se, assim que a variação da humidade contribui em 11.5% para a explicação da variação das UFC/m<sup>3</sup>, as PM<sub>2.5</sub>ug/m<sup>3</sup> contribuem em 24.0%, as PM<sub>5</sub>ug/m<sup>3</sup> contribuem em 16.9% e as PM<sub>10</sub>ug/m<sup>3</sup> em 12.0%.

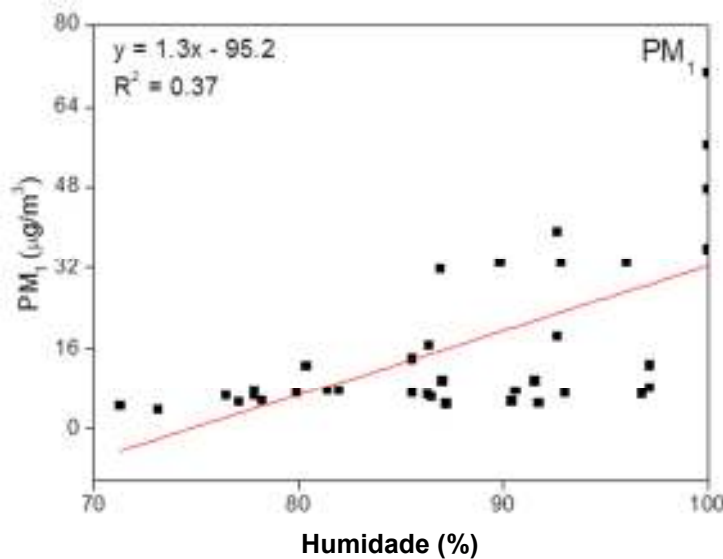
**Tabela 8.** Relação da carga fúngica (UFC/m<sup>3</sup>) com as variáveis ambientais analisadas (Correlação de Pearson)

	Temperatura	Humidade	PM <sub>0.5</sub> ug/m <sup>3</sup>	PM <sub>1.0</sub> ug/m <sup>3</sup>	PM <sub>2.5</sub> ug/m <sup>3</sup>	PM <sub>5</sub> ug/m <sup>3</sup>	PM <sub>10</sub> ug/m <sup>3</sup>
CFU/m <sup>3</sup>	,200	0,340**	,145	,127	0,490*	0,411*	0,347**

\*Correlação significativa ao nível de significância de 1%

\*\*Correlação significativa ao nível de significância de 5%

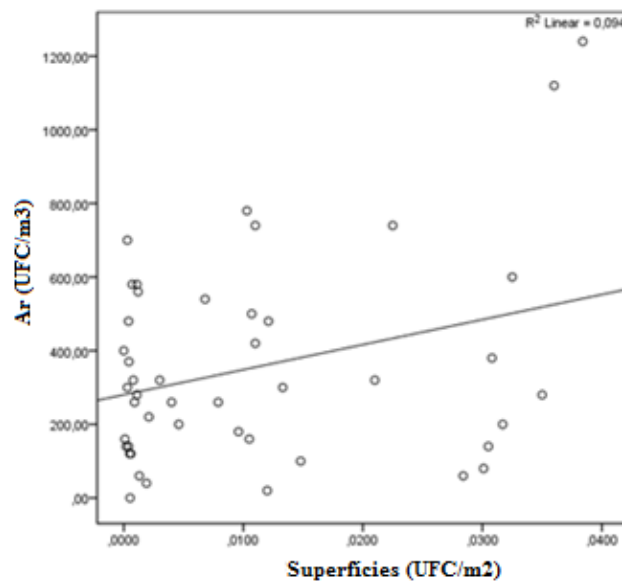
Verificou-se também a contribuição das variáveis ambientais na dispersão partículas. A humidade relativa contribui apenas 37.3 % na explicação da variação das PM<sub>1</sub>, sendo esta a maior contribuição da humidade nas diferentes dimensões das partículas (Figura 7).



**Figura 7.** Contribuição da umidade relativa na explicação da variação das PM<sub>1</sub>

Considerando que os resultados da umidade foram todos superiores a 70.0 %, podemos referir que a contribuição positiva que encontramos para as PM<sub>1</sub> deveu-se à ressuspensão.

A correlação da contaminação fúngica das superfícies (UFC/m<sup>2</sup>) e contaminação fúngica do ar (UFC/m<sup>3</sup>) apresentou uma correlação positiva fraca ( $r=-0.306$ ,  $p=0.039$ ), indicando que a contaminação fúngica das superfícies contribui apenas em 9.4% para a variação da contaminação fúngica do ar (Figura 8).



**Figura 8.** Correlação da contaminação fúngica das superfícies (UFC/m<sup>2</sup>) e a contaminação fúngica do ar (UFC/m<sup>3</sup>)

### 3.3. Influência das partículas na dispersão fúngica nos dois contextos profissionais

#### 3.3.1. Explorações avícolas

Em relação à material particulada, as partículas com maior dimensão foram detectadas em maiores concentrações, designadamente as PM<sub>5.0</sub> (partículas com a dimensão de 5.0 µm ou menos) e PM<sub>10</sub> (partículas com a dimensão de 10 µm ou menos). Os resultados da mediana são apresentados para as 7 explorações estudadas (Tabela 9).

**Tabela 9.** Valores da mediana para a concentração das partículas em cada dimensão

Exploração	PM0.5 (mg/m <sup>3</sup> )	PM1.0 (mg/m <sup>3</sup> )	PM2.5 (mg/m <sup>3</sup> )	PM5.0 (mg/m <sup>3</sup> )	PM10 (mg/m <sup>3</sup> )
A	3.4x10 <sup>-4</sup>	6.7x10 <sup>-4</sup>	59.3x10 <sup>-4</sup>	1.0 x10 <sup>4</sup>	6.0 x10 <sup>4</sup>
B	9.4x10 <sup>-4</sup>	18.6 x10 <sup>-4</sup>	82.8 x10 <sup>-4</sup>	8.4 x10 <sup>2</sup>	3.2 x10 <sup>5</sup>
C	6.8 x10 <sup>-4</sup>	1.2 x10 <sup>-3</sup>	7.4 x10 <sup>-3</sup>	1.1 x10 <sup>5</sup>	8.0 x10 <sup>5</sup>
D	2.7x10 <sup>-4</sup>	4.6 x10 <sup>-4</sup>	1.9 x10 <sup>-3</sup>	3.4 x10 <sup>-2</sup>	2.1 x10 <sup>5</sup>
E	1.4 x10 <sup>-3</sup>	3.1 x10 <sup>-3</sup>	21.6 x10 <sup>-3</sup>	2.1 x10 <sup>5</sup>	5.8 x10 <sup>5</sup>
F	2.3 x10 <sup>-3</sup>	2.8 x10 <sup>-3</sup>	7.9 x10 <sup>-3</sup>	6.5 x10 <sup>-2</sup>	2.6 x10 <sup>5</sup>
G	5.0 x10 <sup>-4</sup>	7.5 x10 <sup>-4</sup>	2.3 x10 <sup>-3</sup>	2.2 x10 <sup>-2</sup>	1.4 x10 <sup>5</sup>

Particularmente, nas unidades A, B, C e E as dimensões de PM<sub>5.0</sub> e PM<sub>10</sub> foram as principais responsáveis pela contaminação causada pela matéria particulada.

No caso das explorações avícolas, não se verificou associação significativa ( $p= 0.01$ ) entre nenhuma das dimensões avaliadas das partículas no ar e as UFC/m<sup>3</sup>, apesar de ter sido evidenciada associação significativa entre a carga fúngica presente na cama e no ar, como referido anteriormente. Tendo em conta estes resultados, considerou-se que a contaminação fúngica no ar destas explorações é mais influenciada pela cama (fonte de contaminação interna) do que pela dispersão de partículas.

#### 3.3.2. Explorações suínolas

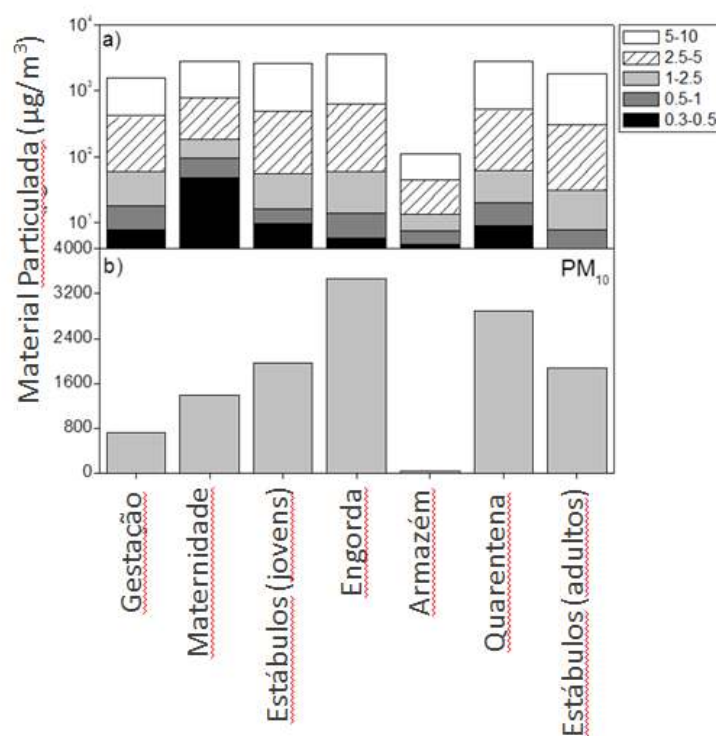
O teste de Friedman demonstrou a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as cinco dimensões das partículas. ( $\chi^2 = 228, p = 0,000$ ) O teste para comparações múltiplas revelou a existência de diferenças estatisticamente significativas entre todas as dimensões das partículas. Verificou-se também que as partículas de menores dimensões apresentaram valores de contaminação inferiores.

A distribuição da dimensão das partículas apresentou a mesma dimensão em todas as explorações suínolas. No entanto, as explorações B e D, apresentaram maiores valores de contaminação, particularmente nas PM<sub>5</sub> e PM<sub>10</sub> (Tabela 10). Estas duas explorações eram as únicas que tinham apenas ventilação natural como forma de ventilação, sendo que as restantes apresentavam ventilação natural e mecânica (exaustão).

**Tabela 10.** Medições das partículas obtidas em cada exploração suinícola (média/mg.m<sup>-3</sup>)

Explorações	Nº de medidas	PM0.5	PM1.0	PM2.5	PM5.0	PM10.0
A	11	9.1x10 <sup>-4</sup>	1.4x10 <sup>-3</sup>	5.1x10 <sup>-3</sup>	4.9 x10 <sup>-2</sup>	2.4
B	7	1.9x10 <sup>-3</sup>	5.4x10 <sup>-3</sup>	1.6x10 <sup>-2</sup>	1.1	4.9
C	6	2.5x10 <sup>-4</sup>	7.4x10 <sup>-4</sup>	4.6x10 <sup>-3</sup>	4.5x10 <sup>-2</sup>	2.0
D	5	2.8x10 <sup>-4</sup>	9.3x10 <sup>-4</sup>	8.8x10 <sup>-3</sup>	1.1	5.8
E	3	2.3x10 <sup>-3</sup>	4.3x10 <sup>-3</sup>	1.2x10 <sup>-2</sup>	6.0x10 <sup>-2</sup>	1.9
F	7	1.4x10 <sup>-4</sup>	8.6x10 <sup>-4</sup>	7.6x10 <sup>-3</sup>	7.9x10 <sup>-2</sup>	3.5
G	11	3.9x10 <sup>-4</sup>	7.6x10 <sup>-4</sup>	3.8x10 <sup>-3</sup>	4.5x10 <sup>-2</sup>	2.3

Verificou-se que a concentração de partículas é maior na zona das engordas do que na zona das maternidades, considerando as PM<sub>10</sub>.

**Figura 9.** a) Distribuição das partículas por granulometrias nos diferentes locais das explorações

b) Distribuição das PM<sub>10</sub> nos diferentes locais das explorações

Como apresentado em tabela anterior (Tabela 8), verificou-se que as PM<sub>2.5</sub>µg/m<sup>3</sup> contribuem em 24.0%, as PM<sub>5</sub>µg/m<sup>3</sup> contribuem em 16.9% e as PM<sub>10</sub>µg/m<sup>3</sup> em 12.0% para a dispersão da carga fúngica (UFC/m<sup>3</sup>). No entanto, é importante referir que existem outras variáveis ambientais que se conhecem, como podendo igualmente influenciar a disseminação fúngica.

### 3.4. Pontos críticos referentes à exposição a fungos e partículas nos dois contextos profissionais

#### 3.4.1. Explorações avícolas

Devido a constrangimentos financeiros e de autorização para acompanhar as atividades, houve necessidade de seleccionar as atividades mais críticas no que concerne à exposição dos factores de risco estudados. Assim, apesar de todas as etapas ao longo da indústria avícola poderem originar exposição a partículas e fungos, potencialmente causadoras de irritação e/ou doença respiratória alérgica ou tóxica, apenas foi possível caracterizar a exposição aos dois factores de risco, no interior dos pavilhões aquando das tarefas rotineiras e durante a adição de cama fresca e do “revirar” da mesma.

Verificou-se que os trabalhadores deslocam-se ao interior dos pavilhões 3 a 4 vezes por dia para realizar as atividades rotineiras (adição de ração, muda de água, observação das aves, entre outras) durante intervalos de tempo entre os 30 a 40 minutos. Em relação à muda ou “revirar” da cama, apesar de ser uma tarefa mais demorada (podendo demorar alguns dias) ocorre esporadicamente, estando dependente, a sua frequência, de diversas variáveis, designadamente: o tipo de ave e o tempo que demora a crescer antes de ir para o matadouro, o tipo de ração, o tipo de cama utilizada, entre outras.

Os trabalhadores das explorações visitadas realizavam todas as tarefas inerentes ao funcionamento das explorações, pelo que a avaliação da exposição a fungos e partículas deverá considerar o interior do pavilhões e a duração decorrente da permanência dos mesmos nesses espaços (3 a 4 vezes por dia/ 30 a 40 minutos).

Foi possível verificar que todos se deslocavam ao interior dos pavilhões sem equipamentos de protecção individual, não havendo, na maior parte dos casos, equipamentos à sua disposição.

#### 3.4.2. Explorações suínicas

Ao contrário do que é referido em referências internacionais consultadas, em Portugal, algumas das atividades carecem ainda da presença e intervenção efectiva dos trabalhadores, designadamente a alimentação manual, manutenção dos pavimentos decorrentes da deposição da matéria fecal, corte dos rabos dos leitões, vacinação, recolha de esperma, injeção de esperma, entre outras, que provocam o aumento de tempo despendido junto aos animais e, conseqüente, o tempo de exposição a fungos e partículas. Estas atividades decorrem em contínuo entre as diferentes áreas de uma exploração, nomeadamente: gestação, maternidade, engorda (celas ou parques) e quarentena.

Nesta indústria, os trabalhadores são polyvalentes realizando todas as atividades inerentes à produção suínica. Deste modo, pode-se concluir que estão em permanência no mesmo ambiente em que os animais se encontram. Neste caso, salienta-se, que além da exposição por via inalatória à carga fúngica ocorre, igualmente a exposição por via dérmica, tendo em conta não só as espécies fúngicas isoladas (p.e. *Scopulariopsis* sp.) (Sabino et al., 2012) mas também o fato dos trabalhadores entrarem em contato com os animais sem qualquer equipamento de protecção individual.

Apesar das PM5 contribuírem apenas em 15.0% para a explicação da variação das UFC/m<sup>3</sup>, devemos considerar, de modo preventivo, os locais com maior contaminação por partículas os mais contaminados também por espécies fúngicas.

### 3.5. Alterações da função respiratória, reações alérgicas adquiridas e sensibilização aos agentes fúngicos dos trabalhadores expostos

#### 3.5.1. Parâmetros espirométricos

As espirometrias foram realizadas numa amostra de 46 trabalhadores de explorações avícolas, 69.6% do género masculino e 30.4% do feminino. Os dados de fumadores e de não fumadores foram analisados separadamente. Foi utilizada a estatística descritiva devido à dimensão reduzida da amostra. A prevalência da alteração ventilatória obstrutiva foi superior nos indivíduos com maior tempo de exposição (31.7%) independentemente de serem fumadores (17.1%) ou não fumadores (14.6%).

Relativamente às explorações suinícolas, 8 trabalhadores (38.8%) foram excluídos do estudo pois tinham antecedentes de patologia pulmonar. Assim, foram estudados 18 trabalhadores, dos quais 66.7% eram do género masculino e 33.3% do género feminino. A média de idades era de  $41.5 \pm 12.1$  anos e a duração média da exposição foi de 8.9 anos. Relativamente aos hábitos tabágicos, 38.9% eram fumadores, 50% eram não fumadores e 11.1% eram ex-fumadores. Apenas 4 participantes (22.2%) apresentaram uma alteração ventilatória obstrutiva. Destes, as obstruções mais graves encontraram-se nos que também apresentavam maior tempo de exposição.

Não foi estudada a associação dos resultados com o uso de equipamento de proteção individual devido ao reduzido tamanho da amostra, à inconsistência desses dados nas respostas ao questionários e ao facto de a maioria dos trabalhadores ter referido não utilizar qualquer proteção.

#### 3.5.2. Dados clínicos e epidemiológicos

Foram avaliados 80 trabalhadores destes dois sectores profissionais, nomeadamente 47 (58,8%) trabalhadores de aviários e 33 (41,2%) de suiniculturas. A idade média dos trabalhadores foi  $42.7 \pm 11.8$  anos, maioritariamente entre os 31 e os 58 anos (76,25%).

A prevalência de asma na amostra em estudo foi de 8,75%. A sintomatologia respiratória em profissionais asmáticos caracterizou-se pela presença de sibilos e/ou pieira associada a dispneia (80%), a dispneia em repouso (57,1%) ou após atividade extenuante (71,4%) e manifestações noturnas como acordar com uma crise de dispneia (42,9%) foram os sintomas mais frequentes nos profissionais asmáticos em estudo.

Todos os trabalhadores asmáticos apresentavam diagnóstico médico de asma, com 57,1% dos casos a reportar a primeira crise de asma após os 40 anos de idade, o que sugere que a asma desenvolveu-se durante a fase adulta em resultado de uma eventual exposição ocupacional. Foram ainda detetadas outras manifestações alérgicas, como rinite (n=16, 20%) e eczema (n=25; 31,3%). Inclusivamente, cerca de 72% (n=18) dos trabalhadores com eczema consideraram que este problema está relacionado com o seu trabalho.

Verificou-se também uma prevalência elevada de sintomatologia respiratória em profissionais não asmáticos, nomeadamente sibilos associados a dispneia (n=5; 23,8%) e dispneia após atividade extenuante (n=9; 12,3%). Para além disso, 18,75% (n=12) dos trabalhadores manifestaram a presença de espirros, corrimento nasal ou nariz entupido, sem estarem constipados ou com gripe e também sem diagnóstico médico de rinite.

Relativamente à sintomatologia respiratória associada à exposição profissional, 12 (15.0%) profissionais manifestaram opressão torácica ou pieira associados a uma atividade decorrente da sua profissão, como a reprodução, o ambiente das explorações (temperatura, poeira), o uso de detergentes e desinfetantes, preparação e/ou contato com alimentação dos animais, o contato direto com os animais e seu alojamento, como também com a sua medicação. Cerca de 26 (32.5%) profissionais referiram também uma melhoria da sua função respiratória durante os dias de descanso e de férias ( $p = 0.002$ ), associando os distúrbios respiratórios com a sua atividade profissional.

### 3.5.3. Sensibilização aos agentes fúngicos (IgE)

Relativamente à avaliação do IgE específico através do sistema ImmunoCAP foi apenas realizado em trabalhadores das explorações avícolas (14 mulheres e 33 homens), não tendo sido encontrada associação positiva ( $p < 0.05\%$ ) entre a contaminação fúngica e a sensibilização a antigénios fúngicos. Foi utilizada população controlo (N= 28) seleccionada aleatoriamente de entre um grupo de estudantes e docentes de uma instituição de ensino superior. A prevalência de IgE específico nos trabalhadores foi de 8.5% e de 3.5% no grupo controlo para o mix2, que inclui os alérgenos das espécies *Penicillium notatum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Alternaria alternata* e *Helminthosporium halodes*. A prevalência do IgE específico para o mix4, que inclui os alérgenos das espécies *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*, foi 4.2% para os trabalhadores e 3.5% para o grupo de controlo. Não se verificaram diferenças significativas ( $p < 0.05\%$ ) entre os trabalhadores e a população controlo.

## 3.6. Pesquisa de três espécies/estirpes potencialmente patogénicas/toxinogénicas com recurso à biologia molecular

### 3.6.1. Estirpes toxinogénicas do complexo *A. flavus*

Foram obtidos resultados positivos em 3 colheitas do interior dos pavilhões de 2 explorações avícolas diferentes. Foi confirmada a presença em apenas uma colheita do exterior de uma das 2 explorações, indicando que, em pelo menos uma delas, existe contaminação proveniente de fonte interna (Viegas et al., 2012 e).

As estirpes toxinogénicas não foram isoladas em todos os locais onde *A. flavus* foi identificado pelos métodos convencionais e as estirpes toxinogénicas foram detectadas em locais em que as espécies de *A. flavus* não foram identificadas através dos métodos convencionais (Viegas et al., 2012 e).

### 3.6.2. Complexo *Aspergillus fumigatus*

Através dos métodos convencionais, *A. fumigatus* foi encontrado apenas numa colheita de ar. Utilizando os métodos moleculares foi detectado em 7 colheitas de ambiente interior dos pavilhões em 3 explorações diferentes (Viegas et al., 2013 a) *in press*).

Foi confirmada a sua presença em 2 colheitas de ar exterior, indicado que, em pelo menos uma das explorações, existe contaminação proveniente de fonte interna (Viegas et al., 2013 a) *in press*).

### 3.6.3. *Stachybotrys chartarum*

Não foi detectado *S. chartarum* em nenhuma das colheitas de ar realizadas (Viegas et al., 2013 a) *in press*).

## 3.7. Avaliação da exposição dos trabalhadores à micotoxina aflatoxina B1.

### 3.7.1. Explorações avícolas

Dos 31 trabalhadores que acederam participar no estudo, 18 (58.6%) apresentaram valores detectáveis de Aflatoxina B1 (AFB1) com valores entre < 1 ng/ml e 4.23 ng/ml, com um valor médio de 2 ng/ml. De modo contrário, em nenhum dos elementos do grupo de controlo foi detectada AFB1 (Viegas et al., 2012 e).

### 3.7.2. Explorações suínicas

No caso destas explorações, 28 trabalhadores participaram no estudo facultando amostras de sangue e 21 (75.0%) apresentaram valores detectáveis de AFB1 com valores entre < 1 ng/ml e 8.94 ng/ml com um valor médio de 1.91 ng/ml (Viegas et al., 2013 a) *in press*).

## 4. Discussão

### 4.1. Frequência das espécies fúngicas e a sua distribuição no ar e superfícies nos dois contextos profissionais

#### 4.1.1. Explorações avícolas

A presença de espécies fúngicas em ambientes interiores representa um potencial risco para a saúde dos ocupantes, devido à produção de alérgenos, uma vasta gama de micotoxinas, e substâncias inflamatórias, tais como a beta-D-glucano. Na verdade, vários estudos têm demonstrado a relação entre a carga fúngica e os níveis de antígenos fúngicos com a presença de alergia (Bush et al., 2001). Não surpreendentemente, os sintomas respiratórios têm sido evidenciados em trabalhadores expostos a fungos, como é o caso dos trabalhadores das explorações avícolas (Rylander et al., 2006). Comparando a carga fúngica detectada nas 7 explorações analisadas, com um estudo realizado em duas explorações em Zagreb (Rimac et al., 2010), verificou-se que as 2 explorações apresentaram carga fúngica mais elevada do que observada no estudo realizado em explorações portuguesas (31.200 UFC/m<sup>3</sup> - 4900 UFC/m<sup>3</sup> e 68.400 UFC/m<sup>3</sup> - 7600 UFC/m<sup>3</sup> contra 240 CFU/m<sup>3</sup>- 24040 UFC/m<sup>3</sup>). Estas diferenças quantitativas podem dever-se a vários fatores, como as variáveis ambientais, a taxa de ventilação, as tecnologias aplicadas, a densidade animal, tipo de ave, idade das aves, métodos eliminação de fezes e urina e procedimentos de limpeza (Oppliger et al., 2008).

Em concordância com os nossos resultados, também num estudo realizado por Rimac e colegas (Rimac et al., 2010) verificou-se que as espécies pertencentes aos géneros *Scopulariopsis*, *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Penicillium* foram também os mais prevalentes. Importa referir que, algumas das espécies de fungos mais

prevalentes no estudo (*Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp.), têm sido identificadas como agentes causais de reacções de hipersensibilidade em seres humanos, com manifestações clínicas, tais como a rinite alérgica, a asma extrínseca e alveolite (Rimac et al., 2010).

Em relação ao género *Aspergillus*, *A. flavus* (74,5%) foi a espécie mais frequentemente isolada e é uma conhecida produtora das micotoxinas aflatoxinas (Araújo et al., 2003). Também é importante realçar a identificação de *A. fumigatus*, um dos fungos saprófitas mais difundidos no ar e capaz de causar aspergilose grave ou fatal (Yao et al., 2007). Importante também referir que, de acordo com a American Industrial Hygiene Association (AIHA), em 1996, para a determinação de contaminação biológica em amostras ambientais, a presença confirmada das espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor* e *Aspergillus fumigatus*, todas elas isoladas nas explorações analisadas, requer a implementação de medidas corretivas (American Industrial Hygiene Association (AIHA), 1996).

*Aspergillus versicolor*, a espécie fúngica mais comum nas superfícies, é um conhecido produtor da micotoxina sterigmastocystina, classificada como hepatotóxica e carcinogénica (Engelhart et al., 2002). Esta micotoxina é classificada pela International Agency for Research on Cancer como pertencente ao grupo 2B, ou seja como possível agente carcinogénico para o Homem (International Agency for Research on Cancer, 1987).

#### 4.1.2. Explorações suínolas

Vários substratos presentes nas explorações suínolas, como rações contaminadas, cobertura do pavimento e as fezes dos animais podem potenciar a presença de bioaerossóis (Seedorf et al., 1996; Adhikari et al., 2004). Além dos fungos, também os seus metabolitos como as micotoxinas, tem um papel importante nas reacções inflamatórias e da deterioração da função respiratória (Heedrik et al., 1991; Ghio and Roggli, 1995; Bondy and Pestka; 2000; Cleave et al., 2010). No mesmo setting ocupacional, já foi reportada a exposição aos metabolitos fúngicos por diversos estudos realizados (Kim et al., 2008; Duchaine et al., 2000; Louhelainen et al., 2001; Willson et al., 2008).

As espécies mais frequentes presentes no ar das 7 explorações analisadas foram *Aspergillus versicolor*, *Scopulariopsis brevicaulis* e espécies pertencentes ao género *Penicillium*, tendo sido obtidos resultados semelhantes noutro estudo (Jo e Kang, 2005), com o género *Aspergillus* e *Penicillium* a serem também os predominantes nas explorações suínolas analisadas nesse estudo.

Nas superfícies, *A. versicolor* foi o mais frequente, seguido de *Cladosporium* e *Scopulariopsis brevicaulis*. A aerossolização das espécies depende de variáveis ambientais, como a aerossolização das partículas e variáveis fúngicas como o diâmetro do esporo e aerodinâmica (Roussel et al., 2008). Nesse sentido, é necessário considerar que, os resultados respeitantes às espécies presentes nas superfícies e no revestimento do pavimento, devem ser utilizados para avaliar a exposição ocupacional à contaminação fúngica (Buttner and Stetzenbach, 1993, Srikanth et al., 2008; Hayashi and Osawa, 2009; Lu et al., 2009; Brenier-Pinchart et al., 2009; Reboux et al., 2009; Viegas et al., 2011 b).

*Aspergillus versicolor*, a espécie fúngica mais comuns no ar e superfícies, como já foi referido é um conhecido produtor da micotoxina sterigmastocystina, classificada como hepatotóxica e carcinogénica

(Engelhart et al., 2002), sendo classificada como possível carcinogénico para o Homem (International Agency for Research on Cancer, 1987).

Os fungos são muitas vezes utilizados como indicadores da presença de micotoxinas em settings ocupacionais, devido a mais fácil e rápida detecção, sendo por isso necessário considerar que a exposição não é apenas à carga fúngica, mas também à seterigmastocystin (Thrane et al., 2004). Além disso, de acordo com referência já mencionada (AIHA, 1996), a presença confirmada das espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor* e *Aspergillus fumigatus*, todas elas isoladas no ar das explorações, requer a implementação de medidas correctivas.

A exposição a *Scopulariopsis brevicaulis* tem vindo a ser associada com casos de alergia ocupacional. Várias espécies do género *Scopulariopsis* são conhecidas como causadores de infecções fúngicas oportunistas, sendo a espécie *S. brevicaulis* um conhecido agente de onicomicoses. Face ao exposto, a contaminação das superfícies por esta espécie representa um risco acrescido para a saúde dos trabalhadores (Ponikau et al., 1999).

*Stachybotrys chartarum* foi isolada em duas das 7 explorações analisadas. Este fungo tem uma velocidade de crescimento menor do que outras espécies (Hintikka and Nikulin, 1998), podendo a sua quantificação ser subestimada (Bartlett et al., 2004; Strachan et al., 1990). Além disso, é necessário considerar não apenas a cara fúngica desta espécie, mas também a eventual presença das micotoxinas produzidas pela mesma espécie (Bhan et al., 2011).

## 4.2. Variáveis ambientais que influenciam a exposição a fungos e a partículas

### 4.2.1. Explorações avícolas

Verificou-se uma correlação significativa ( $r = 0.487$ ,  $p = 0.014$ ) entre a temperatura e o nível de contaminação por fungos (UFC/m<sup>3</sup>), semelhante a outros estudos (Wong et al., 2008; Strachan et al., 1990), e confirmando a influência da temperatura na proliferação fúngica.

A medição de partículas permitiu obter informações sobre a distribuição de tamanho das partículas. A correlação significativa entre as partículas de dimensão (PM<sub>0.5</sub> e PM<sub>1.0</sub>) e a humidade relativa pode ser explicado pelo fato de a humidade relativa do ar afetar as partículas inaláveis (aumento dos níveis de humidade relativa do ar diminui a contaminação por partículas), mas não as partículas respiráveis (fracção inferior a 5 µm) (Ellen et al., 2000).

Verificou-se correlação entre a contaminação fúngica da cama (UFC/g) e a contaminação fúngica do ar (UFC/m<sup>3</sup>), provando que a cama dos aviários é uma fonte interna de contaminação fúngica. Através dos resultados obtidos constatou-se que existe uma tendência para a cama constituída por aparas de madeira apresentar maior carga fúngica e a cama constituída pela mistura de aparas de madeira e casca de arroz apresentar menor carga fúngica. No entanto, Kotimaa e colegas (1991) verificaram que a palha e as aparas de madeira apresentaram a maior contaminação, podendo estas divergências ocorrer devido a condições de armazenagem (Kotimaa et al. 1991), e da contaminação presente no ambiente de origem, como por exemplo as serralharias (Crook e Olenchock 1995; Demers et al. 1997; Dennekamp et al. 1999; Tatken 1987). Em relação à idade da cama não se verificou a correlação com a contaminação fúngica encontrada,

pois outras variáveis poderão contribuir para essa mesma contaminação, designadamente: atividade animal, temperatura, humidade relativa, ventilação, densidade animal, tipo de ave, idade das aves, método de alimentação, presença ou ausência de técnicas de limpeza de ar, entre outras (Whyte 2010; Ellen et al., 2000).

#### **4.2.2. Explorações suinícolas**

Foram detectadas correlações significativas em sentido positivo entre as UFC/m<sup>3</sup> e a humidade corroborando os resultados provenientes de outros estudos realizados em diferentes contextos de trabalho (Strachan et al., 1990; Wong et al., 2008).

### **4.3. Influência das partículas na dispersão fúngica nos dois contextos profissionais**

#### **4.3.1. Explorações avícolas**

A dimensão das partículas é um aspeto bastante importante, pois a capacidade de aerossolização, velocidade de sedimentação e de ressuspensão estão dependentes dessa característica (Pedersen et al. 2000). Kemp et al. (2002) reportaram também que, no caso dos fungos, o tipo de esporo é uma característica que condiciona a respectiva dispersão no ar e nas superfícies.

No caso das explorações avícolas, não se verificou associação significativa ( $p= 0.01$ ) entre nenhuma das dimensões avaliadas das partículas no ar e as UFC/m<sup>3</sup>, considerando-se que a contaminação fúngica no ar destas explorações é mais influenciada pela cama (fonte de contaminação interna) do que pela dispersão de partículas (Viegas et al., 2012 a).

#### **4.3.2. Explorações suinícolas**

Em relação às explorações suinícolas, os resultados obtidos são coincidentes com outros estudos que sugerem que a concentração de partículas é maior na zona das engordas do que na zona das maternidades, considerando as PM<sub>10</sub> (Hamon et al., 2012).

Os resultados obtidos apresentam valores mais elevados na dimensão PM<sub>5</sub> e, predominantes nas PM<sub>10</sub>, indicando que as partículas provenientes desta indústria podem penetrar ao nível das trocas gasosas nos pulmões (PM<sub>5</sub>) e podem provar doença através da acumulação nas vias respiratórias superiores, abaixo das cordas vocais (PM<sub>10</sub>) (Vincent e Mark, 1981).

Em relação à capacidade das partículas para transportarem a contaminação fúngica, foram detectadas correlações significativas em sentido positivo entre as UFC/m<sup>3</sup> e as PM<sub>2.5</sub>ug/m<sup>3</sup>, PM<sub>5</sub>ug/m<sup>3</sup> e PM<sub>10</sub>ug/m<sup>3</sup>. Num estudo desenvolvido por Halstensen e colegas numa quinta com produção de cereais, as partículas medidas foram o factor que mais influenciou a exposição a microorganismos, devendo ser por isso recomendadas medidas correctivas que visem a diminuição da dispersão de partículas, não só para diminuir a exposição a este fator de risco, mas também para evitar a proliferação fúngica (Halstensen et al., 2007).

#### **4.4. Pontos críticos referentes à exposição a fungos e partículas nos dois contextos profissionais**

##### **4.4.1. Explorações avícolas**

A adição de cama fresca, durante o crescimento das aves, pode provocar a inalação conjunta de partículas e esporos fúngicos devido, principalmente, à decomposição microbiológica do material constituinte da cama (HSE, 2008).

A cama é um dos factores que mais contribuem para a contaminação fúngica nas explorações avícolas (HSE, 2008; Just et al. 2009; Williams, 2010; Viegas et al., 2012 a). Além disso, a aplicação da nova cama é uma das atividades que normalmente envolve uma maior exposição dos trabalhadores a partículas (Whyte, 2010; Viegas et al., 2012 a); Viegas et al., 2012 f) e, também a fungos e os seus metabolitos, como é o caso dos compostos orgânicos voláteis e micotoxinas (Milner, 2009; Tsapko et al., 2011).

Outra atividade, também reportada em referências internacionais, como sendo mais crítica em matéria de exposição ocupacional a fungos e partículas, é a apanha das aves, não tendo sido possível acompanhar, por falta de autorização por parte dos directores técnicos. A apanha das aves, para serem transportadas para o matadouro, apresenta um risco ocupacional acrescido, tendo em conta que é feito manualmente e as aves ao abanarem as asas, como forma de resistir e fugir, potenciam a aerossolização de partículas e de fungos (HSE, 2008; Oppliger et al. 2008).

##### **4.4.2. Explorações suínicas**

Internacionalmente, verificou-se, através de referências bibliográficas, que não existe a necessidade de operar presencialmente esta indústria, pois a maior parte da edificação possui sistemas automáticos para as tarefas inerentes a esta indústria, designadamente a alimentação mecanizada dos animais (Cleave et al., 2010; Jo e Kang, 2005). No entanto, em Portugal a maior parte das atividades carecem da intervenção dos trabalhadores, existindo algumas áreas com maior contaminação causada pelas partículas (engorda) (Viegas et al., 2013 f), estando em sintonia com outros estudos (Hamon et al., 2012).

Deveremos considerar a engorda como etapa mais crítica também no caso da contaminação fúngica, caso consideremos apenas a carga fúngica. Outras variáveis deverão ser analisadas para avaliar o cenário mais crítico em matéria de contaminação fúngica (Kim et al., 2008; Pearson e Sharples, 1995; Jo e Kang 2005; Viegas et al., 2013 d), pois como se verificou neste estudo as partículas e a humidade relativa influenciam a disseminação fúngica. Estes dois factores – partículas e humidade relativa - podem ser considerados como indicadores de contaminação fúngica neste contexto de trabalho.

#### **4.5. Alterações da função respiratória, reações alérgicas e a sensibilização aos agentes fúngicos dos trabalhadores expostos**

Vários estudos demonstram efeitos respiratórios adversos relacionados com exposição ocupacional em ambientes de produção animal intensiva (Kogevinas et al., 1999; Eduard et al., 2009; May et al., 2012; Harting et al, 2012). Além disso, já foi verificada correlação entre a exposição ambiental nestes locais de trabalho e sintomas respiratórios nos trabalhadores (Donham et al., 1989; 1995; Reynolds et al., 1996; Donham, 1999).

#### 4.5.1. Parâmetros espirométricos

##### 4.5.1.1. Explorações avícolas

Para além da monitorização ambiental, os efeitos adversos na saúde dos trabalhadores expostos foram avaliados, pois as partículas orgânicas constituem um dos principais factores de risco para a saúde respiratória associados à produção animal (Rimac et al., 2010). Relativamente à função respiratória, quer os fumadores, quer os não fumadores com maior tempo de exposição, apresentaram uma prevalência superior de alteração ventilatória obstrutiva, estando estes resultados de acordo com outros estudos (Ávila, 1971; Kiryuchuk et al., 2003; Szczyrek et al., 2011). Contudo, a prevalência não pode ser comparada pois, nos estudos referidos, os critérios utilizados para identificar as alterações ventilatórias não estão descritos. Rimac e colaboradores (2010) não encontraram alterações ventilatórias mas utilizaram um ponto de corte de 70.0% para a relação FEV1/FVC em vez dos 80.0% do presente estudo ou do 5º percentil, sendo este último o critério proposto pela ATS/ERS, 2005.

Não foram encontradas outras alterações ventilatórias. Este facto pode estar relacionado com o tamanho da amostra, pois em trabalhadores de aviários e de suiniculturas está descrita a existência de alterações ventilatórias restritivas e mistas (Alencar, 2004; Omland, 2002). Radon e colegas (2001) verificaram que os trabalhadores dos aviários estavam expostos a concentrações mais elevadas de partículas e que tinham valores médios dos parâmetros funcionais respiratórios mais baixos. Contudo, uma interpretação correta dos resultados só é possível em espirometrias de boa qualidade e a presença de uma percentagem da referência do FEV1 superior à da FVC (Steltner et al., 2004). De facto, se a FVC não for completa pode não ser possível identificar alteração ventilatória obstrutiva. Esta diferença nos resultados também pode ser, parcialmente, explicada pelo “*healthy worker effect*” (HWE), que se relaciona com o défice tanto de morbilidade, como de mortalidade, atribuído a vários factores relacionados com o trabalho quando os trabalhadores e a população em geral são comparados (Li and Sung, 1999; McMichael et al., 1986; Burns et al., 2011, Burch et al., 2010) e que foi observado em indivíduos com exposição ocupacional a alérgenos (Rimac et al., 2010). Este fenómeno ocorre porque indivíduos mais saudáveis têm maior probabilidade de arranjar emprego e de o manter, enquanto que indivíduos doentes e portadores de deficiências são mais excluídos pelas entidades empregadores (Moual et al., 2008; Thygesen et al., 2011).

##### 4.5.1.2. Explorações suínolas

Relativamente às explorações suínolas, como já foi referido, a amostra foi constituída por apenas 18 trabalhadores dos quais 4 (22.2%) apresentaram uma alteração ventilatória obstrutiva. Embora tenha sido observado que as alterações mais graves foram encontradas nos trabalhadores com maior tempo de exposição, o número reduzido quer de participantes quer de alterações ventilatórias não permitiu estudar qualquer tipo de associação entre as diferentes variáveis em estudo.

#### 4.5.2. Dados clínicos e epidemiológicos

Todos os trabalhadores asmáticos apresentavam diagnóstico médico de asma, com 57.1% dos casos a reportar a primeira crise de asma após os 40 anos de idade, o que sugere que a asma desenvolveu-se

durante a fase adulta em resultado de uma eventual exposição ocupacional. Foram ainda detetadas outras manifestações alérgicas, como rinite (n=16, 20.0%) e eczema (n=25; 31.3%). Inclusivamente, cerca de 72.0% (n=18) dos trabalhadores com eczema consideraram que este problema está relacionado com o seu trabalho.

Verificou-se também uma prevalência elevada de sintomatologia respiratória em profissionais não asmáticos, nomeadamente sibilos associados a dispneia (n=5; 23.8%) e dispneia após atividade extenuante (n=9; 12.3%). Para além disso, 18.75% (n=12) dos trabalhadores manifestaram a presença de espirros, corrimento nasal ou nariz entupido, sem estarem constipados ou com gripe e também sem diagnóstico médico de rinite. Tal pode sugerir um sub-diagnóstico que é frequente tanto na asma, como na rinite (GINA 2009; ARIA 2010).

Relativamente à sintomatologia respiratória associada à exposição profissional, 12 (15.0%) profissionais manifestaram opressão torácica ou pieira associados a uma atividade decorrente da sua profissão, como o ambiente das explorações (temperatura, partículas), o uso de detergentes e desinfetantes, preparação e/ou contato com alimentação dos animais, o contato direto com os animais e seu alojamento, como também com a sua medicação. Cerca de 26 (32.5%) profissionais referiram também uma melhoria da sua função respiratória durante os dias de descanso e de férias ( $p = 0.002$ ), associando os distúrbios respiratórios com a sua atividade profissional. Este aspeto sugere uma sub-valorização dos sintomas respiratórios associados à prática profissional (Ayres, 2011) e uma má interpretação da evolução da doença que é frequente no caso do asmático (Loignon, 2009).

#### **4.5.3. Sensibilização aos agentes fúngicos (IgE)**

Algumas das espécies prevalentes isoladas nas explorações analisadas, têm sido descritas como causadores de reações de hipersensibilidade no Homem. Tal como o descrito em estudos semelhantes, os resultados obtidos sugerem o efeito "*healthy work effect*" (Rimac et al., 2009) no qual a seleção da ocupação é condicionada pelo estado de saúde dos indivíduos, verificando-se que existem menos trabalhadores com hipersensibilidade pré-existente nas explorações avícolas do que esperado.

#### **4.6. Aferir a existência de 3 espécies/estirpes potencialmente patogénicas/toxinogénicas com recurso à biologia molecular**

No que concerne à determinação de riscos para a saúde provenientes dos agentes biológicos, a sua complexidade provém das diferenças na susceptibilidade individual e na diversidade das propriedades biológicas, fisiológicas ou genéticas dos próprios microrganismos, dificultando uma adopção universal de directrizes numéricas para níveis de exposição a fungos (Sigler et al., 1996). Apesar de já terem sido propostos valores limite para a contaminação fúngica do ar, estes valores não são consensuais devido não só à razão anterior, mas também devido à falta de uniformidade dos procedimentos inerentes à monitorização ambiental (Green et al., 2006) e aos métodos laboratoriais.

Ao utilizar apenas os métodos convencionais (cultura das espécies fúngicas), os resultados podem ser subestimados devido a determinada temperatura de incubação ser inibidora do crescimento de algumas

espécies fúngicas, podendo, no entanto, favorecer o crescimento de outras (Zorman e Jerseck, 2008). Além disso, e devido às diferentes taxas de crescimento dos diferentes fungos, poderá ainda ocorrer subestimação de dados, já que os que crescem mais rapidamente poderão inibir o crescimento dos outros. Por último, poderão ter sido colectados organismos não viáveis, ou que não cresçam nos meios de cultura utilizados no processamento laboratorial, e que possuem relevância clínica no contexto referido (Bartlett et al., 2004; Strachan et al., 1990).

Actualmente, a aplicação de metodologias moleculares na detecção e quantificação fúngica tem sido cada vez mais frequente. No entanto, e apesar dos métodos moleculares serem mais sensíveis, específicos e rápidos (Stetzenbach et al., 2004), quando se pretende conhecer a distribuição fúngica num contexto ocupacional ainda pouco estudado, os métodos convencionais são essenciais. A biologia molecular apenas permite verificar a existência ou não de fungos no ambiente e, posteriormente, a identificação de espécies específicas, pelo que requer o conhecimento prévio das espécies/estirpes que se pretende pesquisar (Douwes et al., 2003). Além disso, os custos associados às técnicas de biologia molecular são bastante elevados, as informações disponíveis ainda são escassas para algumas espécies fúngicas (Horner, 2003) e é ainda recomendada a confirmação da identificação fúngica por biologia molecular através dos métodos convencionais (Borman, 2009).

Ambos os métodos apresentam vantagens e limitações quando aplicados no contexto ocupacional, em que se pretende conhecer a exposição profissional a agentes biológicos. No entanto, quando aplicados conjuntamente, tornam-se ferramentas essenciais numa intervenção criteriosa (Viegas et al., 2012 g).

De acordo com a American Industrial Hygiene Association (AIHA, 1996), a contaminação biológica de amostras ambientais com *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* e *Stachybotrys chartarum* requer a implementação de medidas correctivas. É de notar que, sendo uma das espécies de fungos saprófitos mais comum no ar, o *Aspergillus fumigatus* é responsável por aspergiloses graves, levando por vezes à morte dos indivíduos afectados (Yao e Mainelis, 2007). *Aspergillus flavus* é um complexo de espécies conhecidas como produtoras de micotoxinas (aflatoxina) (AIHA, 1996) e *Stachybotrys chartarum* é um fungo que produz diversas micotoxinas, incluindo a satratoxin G (Bhan et al., 2011).

Em relação às estirpes toxinogénicas do complexo *A. flavus*, estas foram detectadas em 2 de 5 explorações analisadas. Uma das duas explorações não apresentou a estirpe toxinogénica na colheita exterior, confirmando que existem fontes de contaminação interna no interior dos pavilhões, podendo ser proveniente da cama coma ou ração contaminada (HSE, 2008; Just et al., 2009).

No caso do *A. fumigatus*, apesar de possuir uma grande facilidade de dispersão (O’Gorman, 2011), apenas foi identificado numa amostra de ar e em menor prevalência nas superfícies do que o *A. flavus*, podendo dever-se ao facto de, sendo uma espécie termofílica, apresenta como temperatura ideal de crescimento os 40°C (Fullerenger et al., 2005), não encontrando, por isso, as condições ideais de crescimento, devido às amostras ambientais terem sido incubadas a 27°C. Nesse sentido, aplicando apenas os métodos convencionais, os resultados respeitantes a esta espécie, poderão estar subestimados (Viegas et al., 2013 a) *in press*) sendo por isso essencial recorrer aos métodos moleculares. Os resultados obtidos corroboram

esta justificação, pois foi detectado, através da biologia molecular, em 7 colheitas de ar do interior dos pavilhões de 3 explorações diferentes.

No que concerne ao *S. chartarum*, esta espécie não é facilmente detetada em colheitas de ar devido às características dos seus esporos (Duchaine e Meriaux, 2001), pelo que poderá ter sido um dos motivos pelo qual não foi detectado por biologia molecular, tendo em conta que apenas realizámos colheitas de ar para a pesquisa através destes métodos. No entanto, a utilização desta metodologia, para a pesquisa desta espécie, continua a ser pertinente, pois sendo uma espécie de crescimento lento, poderá ser inibida por outras espécies de crescimento mais rápido (Cooley et al., 1998; Malta-Vacas et al., 2012).

É importante realçar que foram isoladas outras espécies fúngicas, através dos métodos convencionais, com potencial toxinogénico (Viegas et al., 2012 h), pelo que é necessário considerar a possibilidade de ocorrerem interacções entre as diversas micotoxinas eventualmente presentes, aquando da avaliação do risco (Sexton e Hattis, 2007).

#### **4.7. Avaliação da exposição dos trabalhadores aflatoxina B1.**

##### **4.7.1. Explorações avícolas**

Para a avaliação da exposição à aflatoxina B1 (AFB1), foi utilizado um indicador biológico de exposição que permite facultar informação acerca da dose interna relacionada com a exposição ocorrida recentemente e a intensidade da mesma. Deste modo, os resultados obtidos estão relacionados com a contaminação presente no ambiente de trabalho e com as taxas de absorção, que podem variar de indivíduo para indivíduo, e com a atividade que está a ser desenvolvida no momento em que ocorre a exposição (Zhang et al. 2003).

De 31 trabalhadores que acederam participar no estudo (termo de consentimento informado em anexo) 18 apresentaram valores quantificáveis de AFB1 pelo método utilizado (1 ng/ml) e descrito em publicação científica sobre este assunto (Viegas et al., 2013 b). Em contraste, todos os indivíduos utilizados como controlo (n=30) não apresentaram valores detectáveis. O grupo controlo foi criado, de modo a eliminar a possibilidade de exposição por via alimentar, dado não se conhecer a exposição da população portuguesa a esta micotoxina.

Os achados, e a diferença estatisticamente significativa, obtida entre o grupo de trabalhadores e o grupo de controlo, corroboram a hipótese de ocorrer exposição ocupacional a este agente químico neste contexto ocupacional.

As micotoxinas não são voláteis, mas podem ser encontradas no ar associadas a esporos de fungos e a partículas (Committee on Damp Indoor Spaces and Health [CDISH] 2004; Robbins et al. 2004; Bush et al. 2006). Considerando estes aspectos a via de exposição preferencial é a inalatória. Em contextos agrícolas, como o das explorações avícolas, a maioria das operações implicam a exposição a partículas (HSE 2008; Whyte 2010).

O pó orgânico, presente normalmente nestes ambientes, é composto por muitos componentes, incluindo microorganismos e as suas toxinas e enzimas (Tsapko et al. 2011). AFB1 é provavelmente transportada para a zona respiratória dos trabalhadores pelas partículas e, deste modo, pode-se dizer que as partículas

promovem a exposição a esta micotoxina. No mesmo sentido, Brera e colegas (2002) mediram AFB1 na matéria particulada analisada de diferentes ambientes agrícolas. Previamente, Autrup e colegas (1991) encontraram AFB1 em amostras de matéria particulada colhidas na produção de alimentação animal.

No que concerne à exposição por via inalatória a AFB1, não se conhece ainda a intensidade e duração necessárias para provocar efeitos negativos para a saúde, devido ao número insuficiente de estudos sobre este tema (Halstensen 2008). No entanto, existem suficientes dados experimentais e epidemiológicos que sugerem que o pulmão é, adicionalmente ao fígado, um alvo da AFB1 (Dvorackova and Pichova 1986; Donnelly et al., 1996; Oyelami et al., 1997; Massey et al., 2000).

#### 4.7.2. Explorações suínicas

No caso das explorações suínicas, observou-se que 75.0% dos trabalhadores (n=28) apresentaram valores detectáveis pelo método utilizado. Do mesmo modo foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre este grupo de trabalhadores e o grupo de controlo. Igualmente, os resultados obtidos confirmam a exposição ocupacional a AFB1 na produção suínica, suportando uma vez mais o risco de micotoxicose.

No caso das suiniculturas, também as partículas têm um papel preponderante na exposição por via inalatória e por via digestiva (deglutição das partículas de maior dimensão). O tempo dispendido no interior dos pavilhões, terá igualmente um papel relevante na exposição neste contexto ocupacional (Viegas et al., 2013 b), *in press*). No entanto, pensa-se que a maior fonte de contaminação por micotoxinas deste setting seja a ração animal, tema bem descrito na literatura científica sobre a matéria (Simas et al., 2007; Pereyra et al., 2011; Gerbaldo et al., 2011; Gowda et al., 2013; Asurmendi et al., 2013).

#### 4.8. Identificação das medidas ambientais preventivas para eliminar/controlar a exposição aos dois fatores de risco

Nas explorações avícolas, constatou-se que a cama dos aviários poderá ser uma fonte de contaminação interna, mas não foi corroborado o transporte veiculado pelas partículas na dispersão das espécies fúngicas. Verificou-se que a temperatura no interior das explorações avícolas influencia a carga fúngica no ar e a humidade influencia algumas dimensões das partículas quantificadas. Face aos resultados foi possível elencar algumas medidas ambientais preventivas a adotar neste *setting* profissional (Tabela 11).

**Tabela 11.** Medidas preventivas a adotar no ambiente das explorações avícolas

Explorações	Parâmetro	Varável dependente	Medidas preventivas
Avícolas	Cama (UFC/g)	Ar (UFC/m <sup>3</sup> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Monitorizar a contaminação fúngica da cama e promover a sua monitorização pelo fornecedor;</li> <li>▪ Aplicar fungicida na cama mediante os resultados da monitorização;</li> </ul>

			<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Assegurar adequadas condições de transporte e armazenamento da cama, de modo a evitar a proliferação fúngica;</li> <li>▪ Evitar a utilização de cama apenas constituída por aparas de madeira.</li> </ul>
	Temperatura	Ar (UFC/m <sup>3</sup> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Evitar o aumento de temperatura acima dos 20°C nos pavilhões e nos armazéns onde está acondicionada a cama e as rações.</li> </ul>
	Humidade	Algumas dimensões de partículas (PM <sub>0,5</sub> e PM <sub>10</sub> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Evitar o aumento da humidade acima de 60.0%, de modo a evitar a proliferação fúngica;</li> <li>▪ Evitar a aerossolização das partículas através da manutenção da cama (renovação) e a substituição da ração seca por húmida sempre que for viável.</li> </ul>

No caso das explorações suínolas, verificou-se correlações significativas em sentido positivo entre as UFC/m<sup>3</sup> e a humidade e algumas das dimensões das partículas quantificadas. No entanto, não se verificou relação entre a contaminação fúngica das superfícies e a do ar. Considerando a relação entre as variáveis ambientais estudadas, foi possível indicar algumas medidas ambientais preventivas a implementar neste contexto profissional (Tabela 12).

**Tabela 12.** Medidas preventivas a adotar no ambiente das explorações suínolas

Explorações	Parâmetro	Varável dependente	Medidas preventivas
Suínolas	Humidade	UFC/m <sup>3</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Evitar o aumento da humidade acima de 60%, de modo a evitar a proliferação fúngica;</li> <li>▪ Substituir a ração seca por húmida, sempre que possível.</li> </ul>
	Partículas	UFC/m <sup>3</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Evitar a aerossolização das partículas e a substituição da ração seca por húmida sempre que for viável.</li> </ul>
	Ventilação	Algumas dimensões de partículas (PM <sub>5</sub> e PM <sub>10</sub> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ As explorações devem dispor de recursos de ventilação natural e mecanizado, de modo a melhorar/ controlar a humidade e a matéria particulada.</li> </ul>

Importa ainda mencionar que, considerando os resultados obtidos com a utilização complementar dos métodos convencionais e moleculares (Viegas et al., 2012 e), é recomendável que a avaliação da contaminação fúngica nestes settings, e, conseqüentemente, a exposição profissional a fungos, seja suportada pelas 2 metodologias.

## 5. Conclusões e perspectivas futuras

Foi possível caracterizar a exposição a fungos e partículas nas explorações avícolas e suinícolas analisadas e contribuir para o conhecimento do risco decorrente dessa exposição. Foi também possível conhecer os sintomas e efeitos sobre a saúde dos respetivos trabalhadores.

Em relação às explorações avícolas foram identificadas espécies fúngicas, potencialmente perigosas e toxinogénicas no ar, cama e superfícies analisadas, realçando a grande incidência da espécie *Aspergillus flavus* no ar. Em relação à material particulada, as partículas com maior dimensão foram detectadas em maiores concentrações, designadamente as PM<sub>5.0</sub> (partículas com a dimensão de 5.0 µm ou menos) e PM<sub>10</sub> (partículas com a dimensão de 10 µm ou menos), indicando que as partículas provenientes desta indústria podem penetrar ao nível das trocas gasosas nos pulmões (PM<sub>5</sub>) e podem provar doença através da acumulação nas vias respiratórias superiores, abaixo das cordas vocais (PM<sub>10</sub>). Neste setting a prevalência da alteração ventilatória obstrutiva foi superior nos indivíduos com maior tempo de exposição (31.7%) independentemente de serem fumadores (17.1%) ou não fumadores (14.6%).

No caso das explorações suinícolas, apesar do género *Aspergillus* ter tido uma frequência de isolamento menor (14.4%), também foram isoladas espécies potencialmente perigosas e toxinogénicas, com especial destaque para a espécie *Aspergillus versicolor*. Relativamente às partículas, foram evidenciados também valores mais elevados na dimensão PM<sub>5</sub> e, predominantes nas PM<sub>10</sub>. Neste contexto, apenas 4 participantes (22.2%) apresentaram uma alteração ventilatória obstrutiva. Destes, as obstruções mais graves encontraram-se nos que também apresentavam maior tempo de exposição.

Além disso, nestes 2 contextos profissionais a prevalência de asma na amostra de trabalhadores em estudo foi de 8.75%, tendo-se verificado também uma prevalência elevada de sintomatologia respiratória em profissionais não asmáticos.

Com os dois novos objetivos propostos pela equipa que assegurou o estudo, concluiu-se que uma avaliação criteriosa da exposição a fungos nestes dois settings, apenas poderá ser assegurada recorrendo aos métodos convencionais e à biologia molecular. Igualmente, foi possível constatar a exposição ocupacional a um agente químico cancerígeno como a micotoxina AFB1. Tratou-se de um achado de particular relevância por nunca ter sido reconhecido, nacional e internacionalmente, como factor de risco presente em ambos os contextos ocupacionais.

Face aos resultados obtidos, é importante salientar que os settings alvo de estudo carecem de uma intervenção integrada em Saúde Ocupacional no âmbito da vigilância ambiental e da vigilância da saúde, com o objetivo de diminuir a exposição aos dois factores de risco propostos estudados (fungos e partículas) e, ainda, a exposição à micotoxina AFB1 e a outros metabolitos que resultam da elevada carga fúngica presente. Para a prossecução desse objetivo sugere-se, como medida primordial, a intervenção dos

Serviços de Saúde Ocupacional para colaborar na implementação das medidas ambientais preventivas, previamente indicadas, e ainda, na adequação do protocolo de vigilância da saúde, caso seja necessário, e na formação e sensibilização dos trabalhadores para a utilização de equipamentos de protecção individual.

Como perspectivas futuras de investigação científica sugere-se:

- Conhecer a influência na proliferação fúngica de variáveis ambientais não analisadas no presente estudo, designadamente o tipo de sistema de ventilação e o tipo de ração;
- Caracterizar a exposição a fungos e partículas nos matadouros que servem as explorações avícolas e suinícolas;
- Avaliar a contaminação do ar interior por micotoxinas, ergosterol e endotoxinas;
- Aferir a exposição dos trabalhadores a outras micotoxinas (gliotoxina, ocratoxina e sterigomisticina) através de indicador biológico de exposição específico;
- Pesquisar, através de técnicas de biologia molecular, as estirpes toxinogénicas das espécies *A.fumigatus*, *A. versicolor* e *A. ochraceus*.

## 6. Referências bibliográficas

1. Adhikari, A., Sen MM., Gupta-Bhattacharya, S. & Chanda, S. (2004). Volumetric assessment of airborne fungi in two sections of a rural indoor dairy cattle shed. *Environment International*, 29(8), 1071–1078.
2. Alencar, M. do CB, Nääs, I. de A. & Gontijo, LA. (2004). Respiratory risks in broiler production workers. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 6, 23–29.
3. Araújo, A. J. G.; Souza, M. A. J.; Bastos, O. M. P. & Oliveira, J. C. (2003). *Onicomicoses for fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. An Braz Dermatol*, 78(4), 455-55.
4. Asurmendi, P.; Barberis, C.; Dalcero, A.; Pascual, L. & Barberis, L. (2013). Survey of *Aspergillus* section Flavi and aflatoxin B1 in brewer's grain used as pig feedstuff in Córdoba, Argentina. *Mycotoxin Research*, 29(1), 3–7.
5. Autrup, JL; Schmidt, J.; Seremet. & Autrup, H. (1991). Determination of exposure to aflatoxins among Danish workers in animal-feed production through the analysis of aflatoxin B1 adducts to serum albumin. *Scandinavian Journal of Work Environment and Health*, 17(6), 436-40.
6. Ávila, R. (1971). Extrinsic allergic alveolitis in workers exposed to fish meal and poultry. *Clinical & Experimental Allergy*, 1(3), 343–346.
7. Ayres J. G.; Boyd, R.; Cowie, H. & Hurley, J. (2011). Costs of occupational asthma in the UK. *Thorax*. 66(2), 128-33.
8. Bartlett, K. H.; Kennedy, S. M.; Brauer, M.; Van, N. C. & Dill, B. (2004). Evaluation and a predictive model of airborne fungal concentrations in school classrooms. *Annals of Occupational Hygiene*. 48(6), 547-554.
9. Bateman, E. D. et al. (2009). Global Initiative for Asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention: Gina executive summary. *European Respiratory Journal*, 31(1), 143-78, doi: 10.1183/09031936.00138707.
10. Bhan, U.; Newstead, M. J.; Zeng, X.; Ballinger, M.N.; Standiford, L.R. & Standiford, T.J. (2011). *Stachybotrys chartarum*-Induced Hypersensitivity Pneumonitis Is TLR9 Dependent. *American Journal of Pathology*, 179(6), 2779-87.
11. Bondy, G. S., & Pestka, J. J. (2000). Immunomodulation by fungal toxins. *Journal of Toxicology and Environment Health*, 3(2), 109–143.
12. Borch, E.; Arinder, P. (2002). Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures. *Meat Science*; 62(3), 381-90.
13. BORMAN, A. (2009). Conventional methods versus molecular biology. In 4th Trends in Medical Mycology, Athens, October 18<sup>th</sup>-21<sup>st</sup>.
14. Brenier-Pinchart, M. P.; Coussa-Rivière; Lebeau, B. & Mallaret, M.R. (2009). Mobile air-decontamination unit and filamentous fungal load in the hematology ward: how efficient at the low-activity mode? *American Journal of Infection Control*, 37(8), 680-682.

15. Brera, C.; Caputi, R.; Miraglia, M.; Iavicoli, I.; Salerno, A. & Carelli, G. (2002). Exposure assessment to mycotoxins in workplaces: aflatoxins and ochratoxin A occurrence in airborne dusts and human sera. *Microchemical Journal*; 73(1), 167-73.
16. Brozek, J.L.; Bousquet, J.; Baena-Cagnani, C.E.; Bonini, S.; Canonica, G. W. & Casale, T. B. (2010). Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (Rev. edição). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(3), 466-76.
17. Brunekreef, B. & Forsberg, B. (2005). Epidemiological evidence of effects of coarse airborne particles on health. *European Respiratory Journal*, 26(2), 309–318, DOI: 10.1183/09031936.05.00001805.
18. Burch, J. B. et al. (2010). Endotoxin exposure and inflammation markers among agricultural workers in Colorado and Nebraska. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 73(1), 5–22.
19. Bush, R. & Portnoy, J. (2001). The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(3), S430-440.
20. Buttner, M. P. & Stetzenbach, L. D. (1993). Monitoring airborne fungal spores in an experimental indoor environment to evaluate sampling methods and the effects of human activity on air sampling. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1), 219-226.
21. Buys, E. M.; Nortjé, G. L.; Jooste, P. J. & Von, H. A. (2000). Bacterial populations associated with bulk packaged beef supplemented with dietary vitamin E. *International Journal of Food Microbiology*, 56(2-3), 239-44.
22. Cleave, J.; Willson, P. J.; Town, J. & Gordon, R. (2010). Fractionation of swine barn dust and assessment of its impact on the respiratory tract following repeated airway exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 73(16), 1090–1101.
23. Committee on Damp Indoor Spaces and Health. Board of Health Promotion and Disease Prevention. (2004). Institute of Medicine of the National Academies. *Damp indoor spaces and health*. Washington (DC): The National Academies Press.
24. Cooley, J. D.; Wong, W. C.; Jumper, C. A. & Straus, D. C. (1998). Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome. *Occupational and Environmental Medicine*, 55(9), 579-584.
25. Crook, B. & Olenchock, S. A. (1995). Industrial workplaces. *Wathes Bioaerosols Handbook*, (Edited by Cox, C. S. & Wathes, C. M., pp.531–545. CRC Press, Boca Raton, USA.
26. Daisey, J. M.; Angell, W. J. & Apte, M.G. (2003). Indoor air quality, ventilation and health symptoms in schools: an analysis of existing information. *Indoor Air*. 13(1), 53-64.
27. Demers, P.; Kennedy, S.; Teschke, K.; Davies, H. & Bartlett, K. (1997). Exposure to wood and microorganisms and respiratory disease among sawmill workers. 12th International Symposium on Epidemiology in Occupational Health (ISEOH), Harare, Zimbabwe, 16–19 September, abstr. 38.
28. Dennekamp, M.; Demers, P.; Bartlett, K.; Davies, H. & Teschke, K. (1999). Endotoxin exposure among softwood lumber mill workers in the Canadian province of British Columbia. *Annals of Agricultural Environmental Medicine*, 6, 141–146.

29. Donham, K.; Cumro, D. (1999). Setting maximum dust exposure levels for people and animals in livestock facilities. In *Dust Control in Animal Production Facilities*, Proc. Congress in Aarhus, Denmark, 30 May-2 June, pp. 93-110, Horsens, Denmark: Danish Institute of Agricultural Sciences, Research Centre Bygholm.
30. Donham, K.; Thu, K. (1995). Understanding the impacts of large-scale swine production. *Proceedings from an Interdisciplinary Scientific Workshop*. Iowa.
31. Donham, K.J; Reynolds, S.; Whitten, P.; Merchant, J.; Burmeister, L.; Poppendorf, W. (1995). Respiratory dysfunction in swine production facility workers: Dose-response relationships of environmental exposures and pulmonary function. *American Journal of Industrial Medicine*, 27, 405-418.
32. Donnelly, P.J. et al. (1996). Biotransformation of aflatoxin B1 in human lung. *Carcinogenesis*, 17(11); 2487-2494.
33. Douwes, J.; Thorne, P. & Pearce, N. (2003). Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Annals of Occupational Hygiene*, 47(3), 187-200.
34. Duchaine, C. & Mériaux, A. (2001). The importance of combining air sampling and surface analysis when studying problematic houses for mold biodiversity determination. *Aerobiologia*, 17(2), 121-125.
35. Duchaine, C.; Grimard, Y. & Cormier, Y. (2000). Influence of building maintenance, environmental factors, and seasons on airborne contaminants of swine confinement buildings. *Journal for the science of occupational and environmental health and safety*, 61(1), 56-63.
36. Dvorackova, I. & Pichova, V. (1986). Pulmonary interstitialfibrosis with eviodence of aflatoxin B<sub>1</sub> in lung tissue. *Journal of Toxicology and. Enviromental. Health*, 18(1), 153-157.
37. Eduard, W.; Pearce, N.& Douwes, J. (2009).Chronic bronchitis, COPD, and lung function in farmers: The role of biological agents. *Chest*, 136(3), 716-725.
38. Ellen, H.H.; Bottcher, R.W.; Von, Wachenfelt E. & Takay, H: (2000). Dust levels and control methods in poultry houses. *Journal of Agricultural Safety and Health*, 6(4), 275-282.
39. Engelhart, S. et al. (2002). Occurrence of oxigenic *Aspergillus versicolor*isolates and sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3886-3890.
40. Flannigan, B. & Gillian, E.W. (1996). Moulds, mycotoxins, and indoor air, Proceedings of the 10th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium, Hamburg, 15-18 September.
41. Fortin M: O processo de investigação: da concepção à realização. 3ª edição, Loures, Lusociência, 2003.
42. Fulleringer, S.L.; Seguin, D.; Warin, S.; Bezille, A.; Desterque, C.; Arne, P.; Chermette, R.; Bretagne, S. ; Guillot, J. (2006). Evolution of the Environmental Contamination by Thermophilic Fungi in a Turkey Confinement House in France Poultry, *Science*, 85, 1875-1880.

43. Gerbaldo, G.A. et al. (2011). Surveillance of Aflatoxin and Microbiota Related to Brewer's Grain Destined for Swine Feed in Argentina. *Veterinary Medicine International*. Article ID 912480, 7 pages.
44. Ghio, A. J. & Roggli, V. L. (1995). Mycotoxins and interstitial lung disease. *Chest* 108(5), 1185–1196.
45. Gowda, N.K.S.; Swamy; H.V.L.N.; Mahajan P. (2013). Recent Advances for Control, Counteraction and Amelioration of Potential Aflatoxins in Animal Feeds, Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects, Prof. Mehdi Razzaghi-Abyaneh (Ed.), ISBN: 978-953-51-0904-4, InTech, DOI: 10.5772/51779. Available from: <http://www.intechopen.com/books/aflatoxins-recent-advances-and-future-prospects/recent-advances-for-control-counteraction-and-amelioration-of-potential-aflatoxins-in-animal-feeds>.
46. Goyer, N., Lavoie, J.; Lazure, L. & Marchand, G. (2001). Bioaerosols in the workplace: evaluation, control and prevention guide. Québec: Institut de Recherche en Santé et en Sécurité du Travail du Québec.
47. Green, J. et al. (2006). Airborne fungal fragments and allergenicity. *Medical Mycology*. 44, Suppl 1, S245-S255.
48. Groopman, J.D. et al. (1992). Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-DNA adducts in people living in Guangxi Autonomous Region, People's Republic of China. *Cancer Research*; 52(1),45-52.
49. Groopman, J.D.; Johnson, D. & Kensler, T.W. (2005). Aflatoxin and hepatitis B virus biomarkers: A paradigm for complex environmental exposures and cancer risk. *Cancer Biomark*, 1(1),5-14.
50. Halstensen, A.S. (2008). Species-specific fungal DNA in airborne dust as surrogate for occupational mycotoxin exposure? *International Journal of Molecular Sciences*,9(12), 2543-2558.
51. Halstensen, A.S.; Nordby, K.C.; Wouters, I.M. & Eduard, W. (2007). Determinants of Microbial Exposure in Grain Farming. *Annals of Occupational Hygiene*,51,(7),581–592.
52. Hamon, L.; Andrès, Y. & Dumont, E: (2012). Aerial pollutants in swine buildings: a review of their characterization and methods to reduce them. *Environmental Science & Technology*,46(22), 12287–12301.
53. Harmon, J.D.; Brumm, M.C.; Jacobson, L.D.; Pohl, S.H.; Stender, D.R.& Stowell, R.R. (2012). Field performance evaluation of a ventilation system: A swine case study. *Applied Engineering in Agriculture*, 28(2), 251-257.
54. Harting, J.R.; Gleason, A.; Romberger, D.J.; Von, Essen, S.G.; Qiu, F.; Alexis, N.; Poole, J.A. (2012). Chronic obstructive pulmonary disease patients have greater systemic responsiveness to ex vivo stimulation with swine dust extract and its components versus healthy volunteers. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, 75(24), 1456-1470.
55. Hayashi, M. & Osawa, H. (2009). A field study on mites and environmental factors in houses In Healthy Buildings, 9<sup>th</sup> international conference & exhibition, Syracuse, NY, September 13-17., 262. Lu et al., 2009.

56. Heedrik, D.; Brouwer, R.; Biersteker, K. & Boleij, J. (1991). Relationship of airborne endotoxins and bacteria levels in pig farms with the lung function and respiratory symptoms of farmers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 62, 595–601.
57. Hintikka, E. L. & Nikulin, M. (1998). Airborne mycotoxins in agricultural and indoor environments. *Indoor Air Suppl.* 4, 66–70.
58. Horner, W. E. (2003). Assessment of the indoor environment: evaluation of mold growth indoors. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 23(3), 519-531.
59. HSE. “Statement of evidence: Respiratory hazards of poultry dust Health and Safety” Executive 03/09 14 pages.
60. Hung, Ling-Ling; Miller, J. David & Dillon, H. Kenneth (1996). *Field Guide for the Determination of Biological Contaminants in Environmental Samples* (2<sup>nd</sup> edição). American Industrial Hygiene Association.
61. IARC. (1987). Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. IARC Monogr Eval Carcinogen Risks Human Suppl. 7, 1–440. PMID:3482203.38
62. International Organization for Standardization – ISO 18593: (2004): Microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs. Geneva: ISO.
63. Jo, W.K. & Kang, J.H. (2005). Exposure levels of airborne bacteria and fungi in Korean swine and poultry sheds. *Archives of Environmental & Occupational Health* 60(3), 140–146.
64. Just, N.; Duchaine, C. & Singh, B. (2009). An aerobiological perspective of dust in cage-housed and floor-housed poultry operations. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 4(13), doi: 10.1186/1745-6673-4-13
65. Kabak, B.; Dobson, A.D.W.; Var, I. 2007. Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46: 593-619.
66. Kasprzyk, I. (2008). Aeromycology main research fields of interest during the last 25 years. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 15(1), 1–7.
67. Kelman, B.J.; Robbins, C.A.; Swenson, L. J., & Hardin, B.D. (2004). Risk from inhaled mycotoxins in indoor office and residential environments. *International Journal of Toxicology*, 23(1), 3–10.
68. Kemp, P.C.; Neumeister-Kemp, H.G., Murray, F. & Lysek, G. (2002). Airborne fungi in nonproblem buildings in a southern-hemisphere Mediterranean climate: Preliminary study of natural and mechanical ventilation. *Indoor Built Environment*, 11, 44–53.
69. Kim, K.Y.; Ko, H.J.; Kim, Y.S. & Kim, C.N. (2008). Assessment of Korean farmer's exposure level to dust in pig buildings. *Annals of Agriculture and Environmental Medicine*, 15(1), 51–58.
70. Kim, K.Y.; Park, J.B.; Kim, C.N. & Lee, K.J. (2006). Distribution of airborne fungi, particulate matter and carbon dioxide in Seoul Metropolitan Subway Stations. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*; 39(4), 325–330.
71. Kirychuk, S.P. et al (2003). Respiratory symptoms and lung function in poultry confinement workers in Western Canada. *Canadian Respiratory Journal*, 10(7), 375-80.

72. Kogevinas, M.; Anto, J.M.; Sunyer, J.; Tobias, A.; Kromhout, H. & Burney, P. (1999). Occupational asthma in Europe and other industrialised areas: A population based study. European community respiratory health survey study group. *Lancet* 353(9133), 1750–1754.
73. Kotimaa, M.H.; Oksanen, L. & Koskela, P. (1991). Feeding and bedding materials as sources of microbial exposure on dairy farms. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 17(2), 117–122.
74. Liao, C.M. & Chen, S.C. (2005). A probabilistic modelling approach to assess human inhalation exposure risks to airborne aflatoxin B1 (AFB1). *Atmospheric Environment*; 39(35), 6481-6490.
75. Loignon, C. Bedos, C.; Sévigny, R. & Leduc, N. (2009). Understanding the self-care strategies of patients with asthma. *Patient Education and Counseling*. 75(2), 256-62.
76. Louhelainen, K., Kangas, J., Veijanen, A. & Viilos, P. (2001). Effect of in situ composting on reducing offensive odors and volatile organic compounds in swineries. *Journal for the science of occupational and environmental health*, 62(2), 159–167.
77. Lues, J.F.; Theron, M.M.; Venter, P. & Rasephei, M.H. (2007). Microbial composition in bioaerosols of a high-throughput chicken-slaughtering facility. *Poultry Science*, 86(1), 142-9.
78. Massey, T.E.; Smith, G.B., Tam, A. S. (2000). Mechanisms of aflatoxin B<sub>1</sub> lung tumorigenesis. *Experimental Lung Research*, 26(8); 673–683.
79. May, S.; Romberger, D.J.; Poole, J.A. (2012). Respiratory health effects of large animal farming environments. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 15(8), 524-541.
80. McMichael, A. J., Spirats, R., and Kupper, L.L. (1986). An epidemiological study of mortality within a cohort of rubber workers, 1964-72. *Journal of Occupational Medicine*, 18, 165–168 Burns et al., 2011.
81. Miller, M. R. et al. (2005). Standardization of spirometry. In V. Brusasco, R. Crapo, and G. Viegi, eds. ATS/ERS taskforce: Standardization of lung function testing. *European Respiratory Journal* 26, 319–338.
82. Millner, P.D. (2009). Bioaerosols associated with animal production operations. *Bioresource Technology* 100(22), 5379–5385.
83. Moloczniak, A. (2002). Qualitative and quantitative analysis of agricultural dust in working environment. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 9(1), 71-8.
84. Moual, N.; Kauffmann, F.; Eisen, E. A. & Kennedy, S. M. (2008). The healthy workereffect in asthma work may cause asthma, but asthma may also influence work. *American Journal of Respiratory and Critical. Care Medicine*, 177(1), 4–10.
85. Nayak, S.; Sashidhar, R.B. & Bhat, R.V. (2001). Quantification and validation of enzyme immunoassay for urinary aflatoxin B1-N7-guanine adduct for biological monitoring of aflatoxins. *Analyst*, 126(2), 179-83.
86. Okoth, S.; Nyongesa, B.; Ayugi, V.; Kang'ethe, E.; Korhonen, H. & Joutsjoki, V. (2012). Toxigenic potential of *Aspergillus* species occurring on maize kernels from two agro-ecological zones in Kenya. *Toxins (Basel)*, 4(11), 991-1007.

87. Olsen, J.H.; Dragsted, L. & Autrup, H. (1988). Cancer risk and occupational exposure to aflatoxins in Denmark. *British Journal of Cancer*, 58(3), 392-6.
88. Omland O (2002) Exposure and respiratory health in farming in temperate zones – a review of the literature. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 9: 119–136.
89. Oppliger, A.; Charrie, N.; Droz, P.O. & Rinsoz, T: (2008). Exposure to bioaerosols in poultry houses at different stages of fattening; use of real-time PCR for airborne bacterial quantification. *Annals of Occupational Hygiene*, 52(5), 405–412.
90. Orciuolo, E. et al. (2007). Effects of *Aspergillus fumigatus* gliotoxin and methylprednisolone on human neutrophils: implications for the pathogenesis of invasive aspergillosis. *Journal of Leukocyte Biology* 82(4), 839–848.
91. Oyelami, O.A.; Maxwell, S.M.; Adelusola, K.A.; Aladekoma, T.A. & Oyelese, A.O. (1997). Aflatoxins in the lungs of children with Kwashiorkor and children with miscellaneous diseases in Nigeria. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, (5186), 623-628.
92. Pearson, C.C. & Sharples, T. J. (1995). Airborne dust concentrations in livestock buildings and the effect of feed. *Journal of Agriculture and Engineering Research*, 60(3), 145–154.
93. Pedersen, S.; Nonnenmann, M.; Rautiainen, R.; Demmers, T.G.; Banhazi, T. & Lyngbye, M. (2000). Dust in Pig Buildings. *Journal of Agricultural Safety and Health*, 6(4), 261-274.
94. Pereyra, C.M.; Cavaglieri, L.R.; Chiacchiera, S. M. & Dalcerro, A.M. (2011). Mycobiota and mycotoxins contamination in raw materials and finished feed intended for fattening pigs production in eastern Argentina. *Veterinary Research Communications*, 35(6), 367–379.
95. Quanjer, P. H.; Tammeling, G. J., Cotes, J. E.; Pedersen, O. F.; Peslin, R. & Yernault, J. C. (1993). Lung volumes and forced ventilator flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. *European Respiratory Journal*, 6(Suppl.16), 5–40.
96. Radon, K; Weber, C.; Iversen, M; Danuser, B.; Pedersen, S. & Nowak, D. (2001) Exposure assessment and lung function in pig and poultry farmers. *Journal of Occupational & Environmental Medicine*, 58(6), 405–410.
97. Reboux, R.; Houdrouge, K. & Gloaguidi-Haore, Z. (2009). Usefulness of environmental fungal surveillance in the prevention of invasive aspergillosis in haematology patients. *Mycoses*, 52, 1 27.
98. Reynolds, S. J.; Streifel, A. J. & McJilton, C. E. (1990). Elevated airborne concentrations of fungi in residential and office environment. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 51(11), 601-604.
99. Rimac, D. et al. (2010). Exposure to poultry dust and health effects in poultry workers: impact of mould and mite allergens. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 83(1), 9-19.
100. Roussel, S. et al. (2008). Characteristics of dwellings contaminated by mould. *Journal of Environmental Monitoring*, 10(6), 724-9.
101. Rylander, R. & Carvalho, M. (2006). Airways inflammation among workers in poultry houses. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 79(6); 487-490.

102. Seedorf, J. et al. (1996). Onychomycosis due to *Scopulariopsis brevicaulis*: Clinical features and response to systemic antifungals. *British Journal of Dermatology*, 135(5), 799–802.
103. Sexton, K. & Hattis, D. (2007). Assessing cumulative health risks from exposure to environmental mixtures—Three fundamental questions. *Environmental Health Perspectives*, 115(5), 825–832.
104. Sigler, L.; Abbott, S.P. & Gauvreau, H. (1996). Assessment of worker exposure to airborne molds in honeybee overwintering facilities. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 57(5), 484–490.
105. Simas, M.M.S. et al. (2007). Determination of fungal microbiota and mycotoxins in brewers grain used in dairy cattle feeding in the State of Bahia, Brazil. *Food Control*, 18, 404–408.
106. Speijers, G.J. & Speijers, M.H. (2004). Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicology Letters*, 153(1), 91–8.
107. Sprikanth, P.; Sudharsanam, S. & Steinberg, R. (2008). Bio-aerosols in indoor environment: composition, health effects and analysis. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 26(4), 302–312.
108. Steltner, H.; Vogel, M.; Sprung, E.; Timmer, J.; Guttmann, J. & Sorichter, S. (2004). Incomplete forced expiration—Estimating vital capacity by a mathematical method. *Respiration*, 71(4), 353–359.
109. Stetzenbach, L. D.; Buttner, M. P. & Cruz, P. (2004). Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Current Opinion in Biotechnology*, 15(3), 170–4.
110. Strachan, D.P.; Flanniga, B.; McCabe, E. & McGarry, F. (1990). Quantification of airborne moulds in the homes of children with and without wheeze. *Thorax*, 45(5), 382–287.
111. Szczyrek, M.; Krawczyk, P.; Milanowski, J.; Jastrzębska, I.; Zwolak, A. & Daniluk J. (2011). Chronic obstructive pulmonary disease in farmers and agricultural workers - an overview. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 18(2), 310–3.
112. Tatken, R., editor. (1987). Health effects of exposure to wood dust: A summary of the literature. Cincinnati, OH: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, NIOSH.
113. Thrane, U. et al. (2004). Diversity in metabolite production by *Fusarium langsethiae*, *Fusarium poae*, and *Fusarium sporotrichioides*. *International Journal of Food Microbiology*, 95(3), 257–266.
114. Thygesen, L. C.; Hvidtfeldt, U. A.; Mikkelsen, S. & Brønnum-Hansen, H. (2011). Quantification of the healthy worker effect: A nationwide cohort study among electricians in Denmark. *BMC Public Health*, 11: 571 O’Gorman.
115. Tsapko, V. et al. (2011). Exposure to bioaerosols in the selected agricultural facilities of the Ukraine and Poland – A review. *Ann Agric Environ Med* 18, 19–27.
116. UVA, A. S. (2006). Diagnóstico e gestão do risco em saúde ocupacional. Lisboa: ISHST.
117. Viegas, C.; Viegas, S.; Veríssimo, C.; Rosado, L. & Santos, Carlos Silva. 2011a. Possíveis implicações da contaminação fúngica num aviário. *Saúde & Tecnologia*, 6, 17–23. ISSN: 1646-9704.

- 118.Viegas, C.; Carolino, E.; Sabino, R.; Viegas, S. & Veríssimo, C. 2011b. Fungal Contamination in Swine: A Potential Occupational Health Threat. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 76, 4-5, 272-280.
- 119.Viegas, C.; Carolino, E.; Malta-Vacas, J.; Sabino, R.; Viegas, S. & Veríssimo, C. 2012a. Fungal contamination of poultry litter: a public health problem. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*; 75(22-23), 1341-50.
- 120.Viegas, S.; Faísca, V.M.; Dias, H. B.; Clérigo, A.; Carolino, E. & Viegas, C. 2012b. Occupational exposure to poultry dust and effects on the respiratory system in workers. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 76(4-5), 230-9. Available from: <http://hdl.handle.net/10400.21/2462>.
- 121.Viegas, C.; Viegas, S.; Monteiro, A.; Carolino, E.; Sabino, R. & Veríssimo, C. 2012c. Air contaminants in animal production: the poultry case. In Longhurst JW, editor. Air pollution XX. WIT Press, 315-23.
- 122.Viegas, C.; Carolino, E.; Sabino, R.; Viegas, S. & Veríssimo, C. 2012d. Fungal Contamination in Swine: A Potential Occupational Health Threat. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 76, 4-5, 272-280.
- 123.Viegas, S.; Veiga, L.; Veríssimo, C.; Sabino, R.; Figueiredo, P.; Almeida, A.; Carolino, E. & Viegas, C. 2012e. Occupational exposure to aflatoxin B<sub>1</sub>: the case of poultry and swine production. *World Mycotoxin Journal*, 6,(3), 309-315.
- 124.Viegas, S.; Almeida-Silva, M. & Viegas, C. 2012f. Exposure to dust in poultry: the importance of task differences for detailed exposure assessment. In Longhurst WS, Brebbia CA, editors. Air pollution XX. Southampton: WIT Press.
- 125.Viegas, C.; Malta-Vacas, J. & Sabino, R. 2012g. Molecular biology versus conventional methods – Complementary methodologies to understand occupational exposure to fungi. International Symposium on Occupational Safety and Hygiene.
- 126.Viegas, C.; Viegas, S.; Monteiro, A.; Carolino, E.; Sabino, R. & Veríssimo, C. 2012h. Air contaminants in animal production: the poultry case. In Longhurst JW, editor. Air pollution XX. WIT Press; 2012. p. 315-23.
- 127.Viegas, C.; Malta-Vacas, J.; Sabino, R.; Viegas, S. & Veríssimo, C. a. Accessing indoor fungal contamination using conventional and molecular methods in Portuguese poultries. In Press. Environmental Monitoring and Assessment.
- 128.Viegas, S.; Veiga, L.; Veríssimo, C.; Sabino, R.; Figueiredo, P.; Almeida, A.; Carolino, E. & Viegas, C. 2013b. Occupational exposure to aflatoxin B<sub>1</sub>: the case of poultry and swine production. *World Mycotoxin Journal*, 6,(3), 309-315.
- 129.Viegas, S.; Faísca, V.M.; Dias, H. B.; Clérigo, A.; Carolino, E. & Viegas, C. 2013c. Occupational exposure to poultry dust and effects on the respiratory system in workers. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 76(4-5), 230-9. Available from: <http://hdl.handle.net/10400.21/2462>.

130. Viegas, C.; Carolino, E.; Sabino, R.; Viegas, S. & Veríssimo, C. 2013d: Fungal Contamination in Swine: A Potential Occupational Health Threat, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 76, 4-5, 272-280.
131. Viegas, S.; Carolina, E. & Viegas, C. 2013f. Exposure to particles in Portuguese swine production. *International Symposium on Occupational Safety and Hygiene*, 433– 434.
132. Viegas, C., Sabino, R; Viegas, S. & Veríssimo, C. 2013g. Occupational exposure to toxigenic *Aspergillus versicolor* in Portuguese swine. *International Symposium on Occupational Safety and Hygiene*, 433 – 434.
133. Vincent, J. & Mark, D.(1981). The basis of dust sampling in occupational hygiene: a critical review. *Annals of Occupational Hygiene*, 24, 375–390.
134. Whyte, P; Collins, J.D.; McGill, K.; Monahan, C. & O'Mahony, H. (2001). Distribution and prevalence of airborne microorganisms in three commercial poultry processing plants. *J Food Prot.*; 64(3), 388-91.
135. Whyte, R. (2010). Occupational exposure of poultry stockmen in current barn systems for egg production in the United Kingdom. *British Poultry Science* 43, 3, 364 – 373.
136. Williams, C. 2010. Poultry waste management in developing countries. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Poultry Development Review*.
137. Willson, P. J. et al. (2008). In vitro production of tumor necrosis factor-alpha by human monocytes stimulated with lipopolysaccharide is positively correlated with increased blood monocytes after exposure to a swine barn. *J. Toxicol. Environ. Health A* 71, 1401–1406.
138. Wong, L., Mui, K.; Hui, P.; Chan, W. & Law, A. (2008). Thermal environmental interference with airborne bacteria and fungi levels in air-conditioned offices. *Indoor and Built Environment*, 17(2), 122-127.
139. Yao, M. & Mainelis, G. (2007). Analysis of Portable Impactor Performance for Enumeration of Viable Bioaerosols. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 4, 514-524.
140. Zhang, J.; Ichiba, M.; Hanaoka, T.; Pan, G.; Yamano, Y. & Hara, K., (2003). Leukocyte 8-hydroxydeoxy-guanosine and aromatic DNA adduct in coke-oven workers with polycyclic aromatic hydrocarbon exposure. *Int Arch Occup Environ Health*. 76, 499-5404.
141. Zorman, T.; Jersek. (2008). Assessment of bioaerosol concentrations in different indoor environments. *Indoor and Built Environment*. 17(2), 155-163.

## Resumo

O projeto “Avaliação da Exposição a Fungos e Partículas em Explorações Avícolas e Suínolas” contemplou um elevado número de colheitas ambientais e biológicas e respectivo processamento laboratorial, sendo apenas possível a sua concretização graças ao financiamento disponibilizado pela Autoridade para as Condições de Trabalho.

Foi realizado um estudo transversal para avaliar a contaminação causada por fungos e partículas em 7 explorações avícolas e 7 explorações suínolas. No que concerne à monitorização biológica, foram medidos os parâmetros espirométricos, utilizando o espirómetro MK8 Microlab, avaliada a existência de sintomas clínicos associados com a asma e outras doenças alérgicas, através de questionário adaptado *European Community Respiratory Health Survey* e, ainda, avaliada a sensibilização aos agentes fúngicos (IgE). Foram ainda adicionados dois objetivos ao estudo, designadamente: aferir a existência de três espécies/estirpes potencialmente patogénicas/toxinogénicas com recurso à biologia molecular e avaliar a exposição dos trabalhadores à micotoxina aflatoxina B1 por recurso a indicador biológico de exposição.

Foram colhidas 27 amostras de ar de 25 litros nas explorações avícolas e 56 de 50 litros nas explorações suínolas através do método de impacto. As colheitas de ar e a medição da concentração das partículas foram realizadas no interior e no exterior dos pavilhões, sendo este último considerado como local de referência. Simultaneamente, a temperatura e a humidade relativa também foram registadas. As colheitas das superfícies foram realizadas através da técnica de zaragatoa, tendo sido utilizado um quadrado de metal inoxidável de 10 cm de lado, de acordo com a International Standard ISO 18593 – 2004. As zaragatoas obtidas (20 das explorações avícolas e 48 das explorações suínolas) foram inoculadas em malte de extract agar (2%) com cloranfenicol (0,05 g/L). Além das colheitas de ar e de superfícies, foram também obtidas colheitas da cama das explorações avícolas (7 novas e 14 usadas) e da cobertura do pavimento das explorações suínolas (3 novas e 4 usadas) e embaladas em sacos esterilizados. Cada amostra foi diluída e inoculada em placas contendo malte extract agar. Todas as amostras foram incubadas a 27,5°C durante 5 a 7 dias e obtidos resultados quantitativos (UFC/m<sup>3</sup>; UFC/m<sup>2</sup>; UFC/g) e qualitativos com a identificação das espécies fúngicas. Para a aplicação dos métodos de biologia molecular foram realizadas colheitas de ar de 300 litros utilizando o método de impinger com a velocidade de recolha de 300 L/min. A identificação molecular de três espécies potencialmente patogénicas e/ou toxinogénicas (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* e *Stachybotrys chartarum*) foram obtidas por PCR em tempo real (PCR TR) utilizando o Rotor-Gene 6000 qPCR Detection System. As medições de partículas foram realizadas por recurso a equipamento de leitura direta (modelo Lighthouse, 2016 IAQ). Este recurso permitiu medir a concentração (mg/m<sup>3</sup>) de partículas em 5 dimensões distintas (PM<sub>0.5</sub>; PM<sub>1.0</sub>; PM<sub>2.5</sub>; PM<sub>5.0</sub>; PM<sub>10</sub>).

Nas explorações avícolas, 28 espécies/géneros de fungos foram isolados no ar, tendo *Aspergillus versicolor* sido a espécie mais frequente (20.9%), seguida por *Scopulariopsis brevicaulis* (17.0%) e *Penicillium* sp. (14.1%). Entre o género *Aspergillus*, *Aspergillus flavus* apresentou o maior número de esporos (>2000 UFC/m<sup>3</sup>). Em relação às superfícies, *A. versicolor* foi detetada em maior número (>3 × 10<sup>-2</sup> UFC/m<sup>2</sup>). Na cama nova, *Penicillium* foi o género mais frequente (59,9%), seguido por *Alternaria*

(17,8%), *Cladosporium* (7,1%) e *Aspergillus* (5,7%). Na cama usada, *Penicillium* sp. foi o mais frequente (42,3%), seguido por *Scopulariopsis* sp. (38,3%), *Trichosporon* sp. (8,8%) e *Aspergillus* sp. (5,5%). Em relação à contaminação por partículas, as partículas com maior dimensão foram detectadas em maiores concentrações, designadamente as PM<sub>5.0</sub> (partículas com a dimensão de 5.0 µm ou menos) e PM<sub>10</sub> (partículas com a dimensão de 10 µm ou menos). Neste *setting* a prevalência da alteração ventilatória obstrutiva foi superior nos indivíduos com maior tempo de exposição (31.7%) independentemente de serem fumadores (17.,1%) ou não fumadores (14.6%). Relativamente à avaliação do IgE específico, foi apenas realizado em trabalhadores das explorações avícolas (14 mulheres e 33 homens), não tendo sido encontrada associação positiva ( $p < 0.05\%$ ) entre a contaminação fúngica e a sensibilização a antigénios fúngicos.

No caso das explorações suínicas, *Aspergillus versicolor* foi a espécie mais frequente (20.9%), seguida por *Scopulariopsis brevicaulis* (17.0%) e *Penicillium* sp. (14.1%). No género *Aspergillus*, *A. versicolor* apresentou o maior isolamento no ar (>2000 UFC/m<sup>3</sup>) e a maior prevalência (41.9%), seguida por *A. flavus* e *A. fumigatus* (8.1%). Em relação às superfícies analisadas, *A. versicolor* foi detetada em maior número (>3 × 10<sup>-2</sup> UFC/m<sup>2</sup>). No caso da cobertura do pavimento das explorações suínicas, o género *Thichoderma* foi o mais frequente na cobertura nova (28.0%) seguida por *A. versicolor* e *Acremonium* sp. (14.0%). O género *Mucor* foi o mais frequente na cobertura usada (25.1%), seguido por *Trichoderma* sp. (18.3%) e *Acremonium* sp. (11.2%). Relativamente às partículas, foram evidenciados também valores mais elevados na dimensão PM<sub>5</sub> e, predominantes nas PM<sub>10</sub>. Neste contexto, apenas 4 participantes (22.2%) apresentaram uma alteração ventilatória obstrutiva. Destes, as obstruções mais graves encontraram-se nos que também apresentavam maior tempo de exposição. A prevalência de asma na amostra de trabalhadores em estudo, pertencentes aos 2 contextos em estudo, foi de 8.75%, tendo-se verificado também uma prevalência elevada de sintomatologia respiratória em profissionais não asmáticos. Em relação à utilização complementar dos métodos convencionais e moleculares, é recomendável que a avaliação da contaminação fúngica nestes settings, e, conseqüentemente, a exposição profissional a fungos, seja suportada pelas duas metodologias e, ainda, que ocorra exposição ocupacional à micotoxina aflatoxina B1 em ambos os contextos profissionais.

Face aos resultados obtidos, é importante salientar que os *settings* alvo de estudo carecem de uma intervenção integrada em Saúde Ocupacional no âmbito da vigilância ambiental e da vigilância da saúde, com o objetivo de diminuir a exposição aos dois factores de risco estudados (fungos e partículas).

**Palavras-chave:** Explorações avícolas e suínicas, contaminação fúngica, partículas, exposição ocupacional, sintomas clínicos

## Résumé

Le projet «Évaluation de l'exposition aux champignons et aux particules dans les élevages de volaille et de porcs" a compris un grand nombre d'échantillons environnementaux et biologiques et son traitement laboratoire eut atteint seulement grâce au financement accordé par l'Autorité pour les Conditions du Travail. Une étude transversale eut mené pour évaluer la contamination causée par les champignons et les particules dans sept élevages de volailles et sept de porcs. En ce qui concerne la surveillance biologique, les paramètres spirométriques eurent mesuré en utilisant le spiromètre MK8 Microlab, en évaluant l'existence de symptômes cliniques associés à l'asthme et d'autres maladies allergiques avec de questionnaires adaptés: European Community Respiratory Health Survey et, aussi, l'évaluation de la sensibilisation aux agents fongiques (IgE). On a également ajouté deux objectifs à l'étude, à savoir: 1) vérifier l'existence de trois espèces potentiellement pathogéniques/toxigènes en récurrent à la biologie moléculaire et 2) évaluer l'exposition des travailleurs à l'aflatoxine B1 par l'utilisation de l'indicateur biologique d'exposition.

On a récolté 27 d'échantillons de 25 litres d'air dans les élevages de volailles et 56 de 50 litres dans les exploitations de porcs en usant la méthode de l'impact. Les échantillons d'air et la mesure de la concentration des particules eurent réalisé à l'intérieur et à l'extérieur des pavillons, en considérant le dernier comme emplacement de référence. À la fois, on a enregistré la température et l'humidité de rapport. Les récoltes de surfaces eurent réalisé en utilisant la technique de l'écouvillon et un carré en métal inoxydable de 10 cm de côté, d'après la norme internationale ISO 18593-2004. Le prélèvement obtenu (20 fermes avicoles et 48 élevages de porcs) eut inoculé sur une gélose d'extrait d'agar (2%) avec du chloramphénicol (0,05 g/L). En plus des cultures de l'air et des surfaces, on a également obtenu des récoltes du lit des élevages de volailles (7 nouveaux et 14 utilisés) et du revêtement de sol des élevages de porcs (3 nouveaux et 4 utilisés), emballés dans des sacs stériles. Chaque échantillon eut dilué et inoculé dans des plaques contenant de la gélose d'extrait d'agar. Tous les échantillons eurent incubé à 27,5 °C pendant 5 à 7 jours; les résultats quantitatifs (UFC/m<sup>3</sup>; UFC/m<sup>2</sup>; UFC/g) et qualitatives eurent eu l'identification des espèces fongiques. On a réalisé des échantillons de 300 litres d'air d'après la méthode *impinger* avec la vitesse de collecte 300 l/min pour l'application des méthodes de biologie moléculaire. L'identification moléculaire de trois espèces potentiellement pathogènes et/ou toxigènes (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* et *Stachybotrys chartarum*) eut obtenu par PCR en temps réel (RT-PCR) en utilisant Rotor-Gene 6000 Système de détection de qPCR. Les mesures de particules eurent effectué d'après l'usage des équipements de lecture directe (modèle Lighthouse, 2016 IAQ). Cette fonction est utilisée pour mesurer la concentration (mg/m<sup>3</sup>) de particules dans cinq dimensions différentes (PM<sub>0,5</sub>; PM<sub>1,0</sub>; PM<sub>2,5</sub>; PM<sub>5,0</sub>; PM<sub>10</sub>).

Dans les élevages de volailles 28 espèces/genres de fungus eurent isolé dans l'air: *Aspergillus versicolor* eut le type le plus fréquent (20,9%), suivie par *Scopulariopsis brevicaulis* (17,0%) et *Penicillium* sp. (14,1%). Entre le genre *Aspergillus*, *Aspergillus flavus* avait eu le plus grand nombre de spores (> 2000 UFC/m<sup>3</sup>). Pour les surfaces, *A. versicolor* eut détecté en excès (> 3 × 10<sup>-2</sup> UFC/m<sup>2</sup>). Dans le nouveau lit, le genre

*Penicillium* était le plus fréquent (59,9%), suivi par *Alternaria* (17,8%), *Cladosporium* (7,1%) et *Aspergillus* (5,7%). Dans le lit utilisé, *Penicillium* sp. était le plus fréquent (42,3%), suivi par *Scopulariopsis* sp. (38,3%) et *Trichosporon* sp. (8,8%) et *Aspergillus* sp. (5,5%). En ce qui concerne la contamination par des particules, les particules les plus grandes eurent détecté dans des concentrations plus élevées, en particulier les PM<sub>5,0</sub> (particules d'une taille de 5,0 microns ou moins) et PM<sub>10</sub> (taille des particules de 10 microns ou moins). Dans ce cadre, la prévalence du changement ventilatoire obstructive fut supérieure pour les sujets avec plus de temps d'exposition (31,7%), fumeurs (17,1%) ou non-fumeurs (14,6%). L'évaluation des IgE spécifiques eut réalisé seulement parmi les travailleurs des élevages de volailles (14 femmes et 33 hommes), en ayant trouvé une association positive ( $p < 0,05\%$ ) entre la contamination fongique et la sensibilisation aux antigènes fongiques.

Dans le cas des élevages de porcs, *Aspergillus versicolor* eut été le type le plus commun (20,9%), suivi par *Scopulariopsis brevicaulis* (17,0%) et *Penicillium* sp. (14,1%). Dans le genre *Aspergillus*, *A. versicolor* avait l'isolation la plus élevée dans l'air ( $> 2000$  UFC/m<sup>3</sup>) et la plus forte prévalence (41,9%), suivie par *A. flavus* et *A. fumigatus* (8,1%). En ce qui concerne les surfaces analysées, *A. versicolor* eut détecté en excès ( $> 3 \times 10^{-2}$  CFU/m<sup>2</sup>). Dans le cas de la couverture des élevages de porcs, le genre *Trichoderma* était le plus fréquent dans la nouvelle couverture (28,0%), suivi par *A. versicolor* et *Acremonium* sp. (14,0%). Le genre *Mucor* eut été le plus fréquent dans la couverture utilisée (25,1%), suivi de *Trichoderma* sp. (18,3%) et *Acremonium* sp. (11,2%). On a également observé des valeurs plus élevées dans la taille PM<sub>5</sub> et des valeurs prédominants dans PM<sub>10</sub> pour les particules. Dans ce contexte, seulement quatre participants (22,2%) eurent eu changement ventilatoire obstructive. Parmi ceux-ci, les obstructions les plus graves eurent identifié parmi ceux avec plus de temps d'exposition. La prévalence de l'asthme dans l'échantillon des travailleurs en étude, des deux contextes étudiés, était de 8,75%, après avoir également vérifié une forte prévalence de symptômes respiratoires chez des professionnels non asthmatiques. En ce qui concerne l'utilisation complémentaire de méthodes classiques et moléculaires, on recommande que l'évaluation de ces paramètres de contamination fongique et, par conséquence, l'exposition professionnelle aux champignons doit être soutenu par les deux méthodes; également l'exposition professionnelle aux mycotoxines aflatoxine B1 se présente dans les deux contextes professionnels.

Par rapport aux résultats, il est important de noter que les endroits objets d'étude ont besoin d'une approche intégrée de la santé occupationnelle dans la surveillance environnementale et dans la surveillance de la santé, afin de réduire l'exposition aux deux facteurs de risque étudiés (les champignons et les particules).

**Mots-clé:** élevages de volailles et de porcs, contamination fongique, particules, exposition professionnelle, symptômes cliniques

## Abstract

The project "Assessment of fungi and particles exposure in poultries and swine" included a large number of environmental and biological samples and laboratory work, being only possible to achieve due to financial support provided by the Portuguese Authority for Working Conditions.

A cross-sectional study was developed in order to assess air contamination caused by fungi and particles in 7 poultries and 7 swine. Regarding biologic monitoring, spirometric parameters were measured, using the MK8 Microlab spirometer, evaluated the existence of clinical symptoms associated with asthma and other allergy diseases by European Community Respiratory Health Survey questionnaire, and also evaluated workers fungal exposure and sensitization (IgE). Were also added two more goals to the study, namely: assessment of three pathogenic/toxinogenic fungal species/strains, through molecular biology, and also, occupational exposure to the biological indicator of exposure from the mycotoxin aflatoxin B1.

Twenty seven air samples of 25 litters in poultries and 56 of 50 litters in swines were collected through impaction method. Air sampling and particles concentration measurement were performed indoor and also outside premises, since this was the place regarded as reference. Simultaneously, temperature and relative humidity were also registered. Surfaces samples were also collected by swabbing the surfaces of the same indoor places, using a 10 by 10 cm square stencil according to the International Standard ISO 18593 – 2004. The obtained swabs (20 from poultries and 48 from swineries) were then plated onto MEA. Besides air and surface samples 7 new and 14 used litter samples were collected from seven poultries in sterilized bags. Each litter sample was diluted and spread onto triplicate Petri dishes containing malt extract agar (2%) with chloramphenicol (0.05 g/L). All samples were incubated at 27.5°C during 5 to 7 days and quantitative (colony forming units – cfu/m<sup>3</sup> and cfu/m<sup>2</sup>) and qualitative results were obtained, with identification of the isolated fungal species. To apply molecular methods samples of 300 liters were collected through impinger method with collection speed of 300L/m. Molecular identification from the three pathogenic/toxinogenic species (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* and *Stachybotrys chartarum*) was obtained by PCR in real time (PCR RT) using the Rotor-Gene 6000 qPCR Detection System. Particle assessment was achieved through direct reading equipment (modelo Lighthouse, 2016 IAQ), allowing concentration measurement (mg/m<sup>3</sup>) in 5 different dimensions (PM<sub>0.5</sub>; PM<sub>1.0</sub>; PM<sub>2.5</sub>; PM<sub>5.0</sub>; PM<sub>10</sub>).

Twenty eight different fungal genres were detected along the study, from the analyzed poultries. *Aspergillus versicolor* was the most frequent species found (20.9%), followed by *Scopulariopsis brevicaulis* (17.0%) and *Penicillium sp.* (14.1%). *Aspergillus flavus*, among *Aspergillus* genus, presented the highest level of airborne spores (>2000 cfu/m<sup>3</sup>). From the analyzed surfaces, *A. versicolor* was detected in higher number (>3x10<sup>-2</sup> cfu/m<sup>2</sup>). In the new litter, *Penicillium* was the genera most found (59.9%), followed by *Alternaria* (17.8%), *Cladosporium* (7.1%) and *Aspergillus* (5.7%). *Penicillium* was the most found (42.3%) in the used litter, followed by *Scopulariopsis sp.* (38.3%), *Trichosporon sp.* (8.8%) and *Aspergillus sp.* (5.5%). Regarding particles contamination, particles with higher dimension were detected in higher concentrations, namely PM<sub>5.0</sub> (particles with 5.0 µm dimension and less) and PM<sub>10</sub> (particles with 10 µm dimension or less).

In this setting, prevalence rate of obstructive ventilatory defect was higher in individuals with longer exposure (3.7%) whether they are smokers (17.1%) or non-smokers (14.6%). Due to the higher level of fungal contamination in poultries, the evaluation of the specific IgE in serum was performed only in the poultries' workers (14 womens and 33 mens). No positive association ( $p>0.05$ ) was found between fungal contamination and sensitization to fungal antigens.

Concerning swine, *Aspergillus versicolor* was the most found (20.9%), followed by *Scopulariopsis brevicaulis* (17.0%) and *Penicillium* sp. (14.1%). Among *Aspergillus* genera, *A. versicolor* presented the highest air fungal load ( $>2000$  UFC/m<sup>3</sup>) and the higher prevalence (41.9%), followed by *A. flavus* and *A. fumigatus* (8.1%). Regarding surfaces, *A. versicolor* was identified with the highest load ( $>3 \times 10^{-2}$  UFC/m<sup>2</sup>). In the floor coverage, *Thichoderma* sp. was the most frequente found in the new coverage (28.0%) followed by *A. versicolor* and *Acremonium* sp. (14.0%). *Mucor* sp. was the most identified in the used coverage (25.1%), followed by *Trichoderma* sp. (18.3%) and *Acremonium* sp. (11.2%). Regarding particles assessment, were found higher values from PM<sub>5</sub> and PM<sub>10</sub>. Only four workers (22.2%) showed an obstructive ventilatory defect. From those, the more severe obstruction was found in the workers that had the longer exposure. Among the workers enrolled in this study, the prevalence of diagnosed asthma was 8.75%, and a high prevalence of respiratory symptoms in professionals without asthma was also observed, Regarding complementary application from conventional and molecular methods, it's suggested that the assessment of fungal contamination and, consequently, fungi occupational exposure, be achieve by the two methods. It was also found that there was occupational exposure to the mycotoxine aflatoxine B1 in both settings.

Taking into account the obtained data, it's important to highlight that the analyzed settings need an integrated intervention in Occupational Health within the environmental monitoring and health surveillance, in order to reduce exposure to the two studied risk factors (fungi and particles).

**Key words:** Poultries and swine, fungal contamination, particles, occupational exposure, clinical symptoms.

## **7. Apêndices**

**7.1. Apêndice 1 - Questionário European Community Respiratory Health Survey**

**7.2. Apêndice 2 - Termo de consentimento informado**

**7.3. Apêndice 3 – Fotos alusivas ao estudo**

**7.4. Apêndice 4 – Listagem da produção científica decorrente do estudo**

**7.4.1. Comunicações orais**

**7.4.2. Publicações em actas de congresso**

**7.4.3. Publicações em livros**

**7.4.4. Publicações em revistas científicas**

**7.4.5. Posters científicos**



## Exposição de Profissionais a Fungos e Partículas em Aviários e Suiniculturas

O presente questionário destina-se a recolher dados que permitam estimar a prevalência de asma ocupacional em profissionais que exercem a sua actividade em aviários e suiniculturas, com a finalidade de integrar um trabalho de investigação no âmbito na Unidade Curricular de Investigação Aplicada na Licenciatura de Farmácia da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa.

Asseguramos o anonimato e confidencialidade do questionário, garantindo que os dados apenas serão utilizados para o fim a que se destinam. Desde já agradecemos a sua colaboração!

Peço-lhe que responda às questões apresentadas com “NÃO” ou “SIM”. Em caso de indecisão, responda “NÃO”.

1. Idade:		Anos	
2. Sexo	M	F	
3. Profissão:	Aviários	Suiniculturas	
4. Alguma vez teve chiadeira ou pieira no peito nos últimos <u>12 meses</u> ?		NÃO	SIM
<i>Se "NÃO", passe à pergunta 5</i>			
<i>Se "SIM", passe à pergunta 4.1.</i>			
4.1. Teve falta de ar quando a chiadeira ou pieira estava presente?		NÃO	SIM
4.2. Teve a chiadeira ou pieira sem estar constipado ou com gripe?		NÃO	SIM
5. Alguma vez acordou com a sensação de aperto no peito nos últimos <u>12 meses</u> ?		NÃO	SIM
6. Alguma vez teve uma crise de falta de ar que surgiu durante o dia quando estava em repouso nos últimos <u>12 meses</u> ?		NÃO	SIM
7. Alguma vez teve uma crise de falta de ar que surgiu a seguir a uma actividade extenuante nos últimos <u>12 meses</u> ?		NÃO	SIM
8. Alguma vez foi acordado por uma crise de falta de ar nos últimos <u>12 meses</u> ?		NÃO	SIM
9. Alguma vez foi acordado por um ataque de tosse nos últimos <u>12 meses</u> ?		NÃO	SIM
10. Tosse, habitualmente, durante o dia ou à noite no Inverno?		NÃO	SIM
11. Alguma vez teve asma?		NÃO	SIM
<i>Se "NÃO", passe à pergunta 12</i>			
<i>Se "SIM", passe à pergunta 11.1.</i>			
11.1. Foi confirmado por um médico?		NÃO	SIM
11.2. Que idade tinha quando teve a sua <u>primeira</u> crise de asma?		Anos	
11.3. Que idade tinha quando teve a sua crise de asma <u>mais recente</u> ?		Anos	
11.4. Teve alguma crise de asma nos últimos <u>12 meses</u> ?		NÃO	SIM
<i>Se "NÃO", passe à pergunta 12</i>			
<i>Se "SIM", passe à pergunta 11.4.1.</i>			
11.4.1. Quantas crises de asma teve nos últimos <u>12 meses</u> ?			
12. A sua mãe alguma vez teve asma?		NÃO	SIM
13. O seu pai alguma vez teve asma?		NÃO	SIM
14. Tem rinite alérgica incluindo febre dos fenos?		NÃO	SIM
<i>Se "NÃO", passe à pergunta 15</i>			
<i>Se "SIM", passe à pergunta 14.1.</i>			
14.1. Que idade tinha quando teve rinite alérgica ou febre dos fenos pela primeira vez?		Anos	

15. Alguma vez teve problemas de espirros, pingo no nariz ou nariz entupido sem estar constipado ou com gripe?	NÃO	SIM
--	-----	-----

*Se "NÃO", passe à pergunta 16.  
Se "SIM", passe à pergunta 15.1.*

15.1. Alguma vez teve problemas de espirros, pingo no nariz ou nariz entupido sem estar constipado ou com gripe nos últimos 12 meses?	NÃO	SIM
---	-----	-----

*Se "NÃO", passe à pergunta 16.  
Se "SIM", passe à pergunta 15.1.1*

15.1.1. Este problema nasal foi acompanhado por comichão nos olhos ou lacrimejo?	NÃO	SIM	
15.1.2 Em que meses do ano ocorreu este problema nasal?	15.1.2.1 Janeiro	NÃO	SIM
	15.1.2.2 Fevereiro	NÃO	SIM
	15.1.2.3 Março	NÃO	SIM
	15.1.2.4 Abril	NÃO	SIM
	15.1.2.5 Maio	NÃO	SIM
	15.1.2.6 Junho	NÃO	SIM
	15.1.2.7 Julho	NÃO	SIM
	15.1.2.8 Agosto	NÃO	SIM
	15.1.2.9 Setembro	NÃO	SIM
	15.1.2.10 Outubro	NÃO	SIM
	15.1.2.11 Novembro	NÃO	SIM
	15.1.2.12 Dezembro	NÃO	SIM
15.1.3. Estes problemas foram desencadeados por:	15.1.3.1. Poléns de gramíneas	NÃO	SIM
	15.1.3.2. Poléns de árvores	NÃO	SIM
	15.1.3.3. Poléns de arbustos	NÃO	SIM
	15.1.3.4. Fungos	NÃO	SIM
	15.1.3.5. Animais	NÃO	SIM
	15.1.3.6. Perfumes, Cheiros ou Fumos	NÃO	SIM
	15.1.3.7. Mudanças de temperatura	NÃO	SIM
	15.1.3.8. Mudanças de posição (tal como deitar-se)	NÃO	SIM
	15.1.3.9. Pó da casa	NÃO	SIM

16. Alguma vez teve eczema ou algum tipo de alergia cutânea?	NÃO	SIM
--	-----	-----

*Se "NÃO", passe à pergunta 17  
Se "SIM", passe para a 16.1*

16.1 Esse problema foi alguma vez associado ao trabalho?	NÃO	SIM
--	-----	-----

*Se "NÃO", passe à pergunta 17  
Se "SIM", passe para a 16.2*

16.2 Qual era o trabalho que estava a fazer, que agravava este problema?		
--	--	--

16.3 Sabe o que provocou o problema no trabalho?	NÃO	SIM
--	-----	-----

16.3.1 Se sim qual foi esse problema?		
---------------------------------------	--	--

17. O estar no trabalho alguma vez lhe provocou opressão torácica ou pieira?	NÃO	SIM
--	-----	-----

17.1 A sua respiração melhora ou melhorava nos fins-de-semana e nas férias?	NÃO	SIM
---	-----	-----

18. Quantos dias de trabalho perdeu por asma/ falta de ar/ pieira nos últimos 12 meses?		Dias
---	--	------

19. Quantas noites passou no Hospital devido a qualquer das seguintes doenças nos últimos cinco anos?	a) Asma		Noites
	b) Infecção Pulmonar		Noites
	c) DPOC		Noites
	d) Sinusite		Noites
	e) Outras QUAL? _____		Noites

19.1 Passou uma noite no Hospital nos últimos 12 meses?	NÃO	SIM
---	-----	-----

20. Nos últimos <u>cinco anos</u> foi a um médico devido a problemas respiratórios ou por falta de ar?	NÃO	SIM
20.1 Foi visto por um médico de clínica geral devido a problemas respiratórios nos últimos <u>12 meses</u> ?	NÃO	SIM
20.1.1 Quantas vezes?	Vezes	
20.2 Foi visto por um médico especialista (pneumologista, alergologista, internista, otorrinolaringologista) devido a problemas respiratórios ou falta de ar, nos últimos <u>12 meses</u> ?	NÃO	SIM
20.2.1 Quantas vezes?	Vezes	
21. Alguma vez fumou durante pelo menos um ano? (SIM significa pelo menos 1 cigarro por dia ou um charuto por semana durante 1 ano)	NÃO	SIM
<i>Se "NÃO", passe à pergunta 22</i> <i>Se "SIM", passe à pergunta 23</i>		
22. Esteve regularmente exposto a fumo de tabaco nos últimos <u>12 meses</u> ?	NÃO	SIM
23. Fez vacinas para a alergia nos últimos <u>5 anos</u> ?	NÃO	SIM
<i>Se "NÃO", passe à pergunta 24</i> <i>Se "SIM", passe à pergunta 23.1</i>		
23.1 Fez vacinas para a alergia nos últimos <u>12 meses</u> ?	NÃO	SIM
24. Quais os medicamentos que lhe foram prescritos para o tratamento da asma? (Colocar o código correspondente ao/s medicamento/s prescrito/s, que se encontra na tabela em anexo)		
25. Com que frequência toma os estes medicamentos?	Código do(s) medicamento(s) correspondente(s)	
25.1. Diariamente?		
25.2. Nos períodos de maior exacerbação da asma?		
25.3. Antes do exercício físico?		
25.4. Em SOS (durante uma crise de asma)?		
25.5. Não toma?		
26. Quais os dispositivos de inalação que utiliza? (Colocar o código correspondente ao/s dispositivos/s que utiliza, que se encontra na tabela em anexo)		

**MUITO OBRIGADA PELA SUA COLABORAÇÃO.**

ANEXO

A	B	C	D
CÓDIGO DO MEDICAMENTO	GRUPO FARMACOTERAPÉUTICO	MEDICAMENTO	CÓDIGO DO DISPOSITIVO DE INALAÇÃO
1	AGONISTAS $\beta_2$ SELECTIVO CURTA ACÇÃO	Bricanyl Turbohaler	5
		Salbutamol Novolizer	7
		Salbutamol Inalador pressurizado	1
		Ventilan Nebulizador	10
		Ventilan-Inalador pressurizado	1
		Ventilan Rotacaps (Rotahaler)	3
		Ventilan Comprimidos	11
2	AGONISTAS $\beta_2$ SELECTIVO LONGA ACÇÃO	Ventilan Xarope	12
		Asmatec Aerolizer	2
		Atimos Inalador pressurizado	1
		Dilamax Diskus	6
		Dilamax Inalador pressurizado	1
		Foradil Aerolizer	2
		Foradil Certihaler	8
		Formoterol MG Novolizer	7
		Formoterol MG Aerolizer	2
		Onsudil Nebulizador	10
		Onsudil Comprimidos	11
		Onsudil Xarope	12
		Oxis Turbohaler	5
		Serevent Inalador pressurizado	1
		Serevent Diskus	6
3	ANTAGONISTAS COLINÉRGICOS	Ultrabeta Inalador pressurizado	1
		Ultrabeta Diskus	6
		Atrovent PA Inalador pressurizado	1
		Atrovent Unidose Inalador pressurizado	1
		Spiriva Handihaler	4
4	GLUCOCORTICOIDES	Spiriva Respimat Nebulizador	10
		Ipraxa Nebulizador	10
		Asmatil Inalador pressurizado	1
		Asmatil Diskus	6
		Asmo-Lavi Inalador pressurizado	1
		Asmo-Lavi Diskus	6
		Beclometasona MG Inalador pressurizado	1
		Beclotaide Inalador pressurizado	1
		Beclotaide Forte Inalador pressurizado	1
		Brisovent Diskus	6
		Brisovent Inalador pressurizado	1
		Budesonido MG Inalador pressurizado	1
		Budesonido MG Novolizer	7
		Ecobec Easi-Breathe sem CFCs Optimiser	9
		Ecobec Inalador pressurizado	1
		Flixotaide Diskus	6
		Flixotaide Inalador pressurizado	1
		Flixotaide Nebules Nebulizador	10
		Miflonide Aerolizer	2
		Miflonide Cápsulas	11
Pulmicort Nebulizador	10		
Pulmicort Inalador pressurizado	1		
Pulmicort Turbohaler	5		
5	ANTAGONISTAS DOS LEUCOTRIENOS	Qvar Autohaler Inalador pressurizado	1
		Accolate Comprimidos revestidos	11
		Lukair Comprimidos revestidos por película	11
		Lukair Junior Comprimidos para mastigar	11
		Singulair Comprimidos revestidos por película	11
6	XANTINAS	Singulair Granulado	11
		Singulair Comprimidos para mastigar	11
		Eufilina Comprimidos de libertação prolongada	11
		Filotempo Comprimidos de libertação prolongada	11
		Neufil Comprimidos	11
7	ANTIASMÁTICOS DE ACÇÃO PROFILÁCTICA	Neufil Xarope	12
		Unicontin Comprimidos de libertação prolongada	11
		Intal 5 Inalador pressurizado	1
8	ANTAGONISTA COLINÉRGICO + AGONISTA $\beta_2$ SELECTIVO CURTA ACÇÃO	Zaditen Cápsulas	11
		Zaditen Xarope	12
		Berodual PA Inalador pressurizado	1
9	GLUCOCORTICOIDE + AGONISTAS $\beta_2$ SELECTIVO LONGA ACÇÃO	Combivent Unidose Nebulizador	10
		Ipramol Nebulizador	10
		Assieme Turbohaler	5
		Brisomax Diskus	6
		Brisomax Inalador pressurizado	1
		Maizar Diskus	6
		Maizar Inalador pressurizado	1
		Seretaide Diskus	6
		Seretaide Inalador pressurizado	1
		Symbicort Turbohaler	5
Veraspir Diskus	6		
Veraspir Inalador pressurizado	1		

7.2. Apêndice 2 - Termo de consentimento informado

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

A Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa encontra-se a desenvolver um projecto de investigação com o tema: “Estudo da exposição profissional a micotoxinas”.

Este projecto tem como objectivos primordiais disponibilizar informação acerca da exposição a estes agentes químicos de modo a permitir realizar um diagnóstico da situação e a definição de medidas de prevenção e controlo da exposição caso se considere necessário.

Para alcançar estes objetivos será realizada colheita de material biológico (sangue) para posterior tratamento e doseamento dos agentes químicos em estudo.

Acresce-se que a **privacidade** assim como a completa **confidencialidade** dos dados obtidos será sempre assegurada.

Se tiver alguma dúvida poderá esclarece-la com as responsáveis pelo projecto. Obrigada pela atenção e disponibilidade.

Eu, \_\_\_\_\_ (preencha com o seu nome completo), dou o meu consentimento livre e informado, para participar na realização da colheita acima referidas, autorizando posterior uso e publicação dos dados.

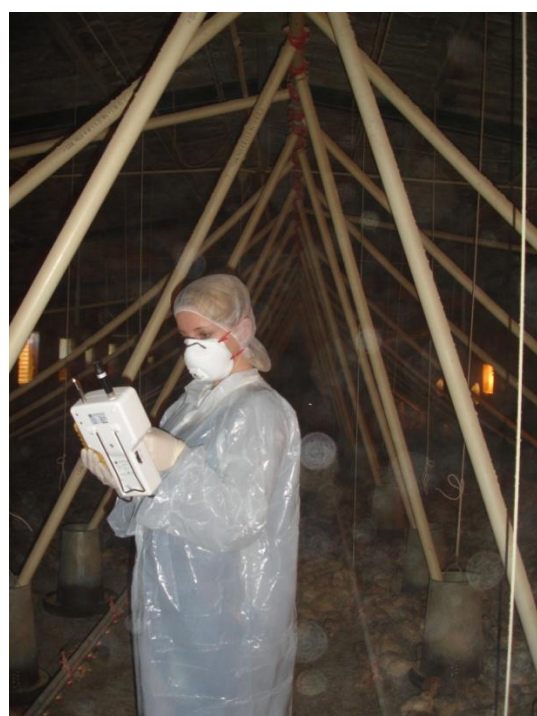
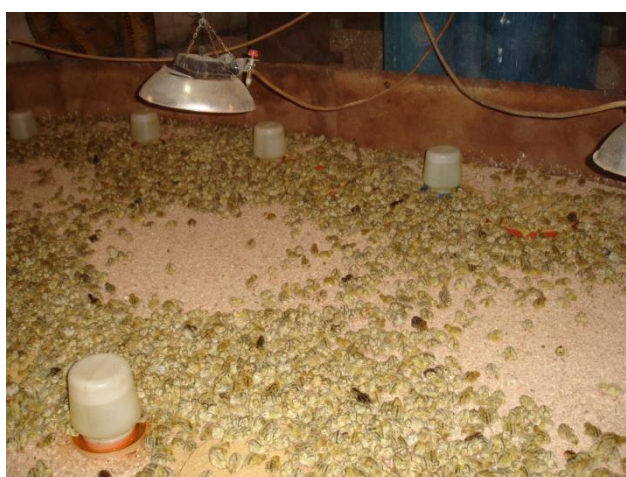
Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Assinatura

\_\_\_\_\_

7.3. Apêndice 3 – Fotos alusivas ao estudo







#### 7.4. Apêndice 4 – Listagem da produção científica decorrente do estudo

##### 7.4.1. Comunicações orais

- Viegas, C.; Viegas, S. ; Almeida-Silva, M.; Veríssimo, C. & Sabino, R. (2013). Environmental impact caused by fungal and particles contamination of Portuguese swine. Environmental Health Risk VII, Budapeste.
- Viegas, C.; Sabino, R. & Veríssimo, C. (2013). Fungal contamination - Comparison between Portuguese Poultry and Swine. International Symposium on Occupational Safety and Hygiene.
- Viegas, C.; Sabino, R.; Viegas, S. & Verissimo, C. (2013). Occupational exposure to toxigenic *Aspergillus versicolor* in Portuguese swine. International Symposium on Occupational Safety and Hygiene.
- Viegas, C. (2012). Exposição Ocupacional a Fungos. Workshop de Micologia. INSA. 23 de Novembro de 2012.
- Viegas, S.; Mateus, V.; Carolino, E. & Viegas, C. (2012). Occupational exposure to poultry dust and the relation with respiratory symptoms. ICEH 2012.
- Malta-Vacas, J.; Sabino, R. & Viegas, C. (2012). Molecular Identification of pathogenic fungi in a waste-sorting plant. ICEH 2012.
- Viegas, C.; Viegas, S.; Sabino, R. & Veríssimo, C. (2012). Fungal contamination of poultry litter: A public health problem. ICEH 2012.
- Viegas, C.; Viegas, S.; Monteiro, A.; Carolino, E.; Sabino, R. & Veríssimo, C. (2012). Air contaminants in animal production – poultry case *in* Air Pollution 2012.
- Viegas, C.; Malta-Vacas, J. & Sabino, R. (2012). Molecular biology versus conventional methods – Complementary methodologies to understand occupational exposure to fungi. International Symposium on Occupational Safety and Hygiene.
- Viegas, C. (2012). Importância da caracterização da contaminação fúngica nos diferentes ambientes interiores. Encontros com a ciência na ESTeSL, 5 de Janeiro de 2012.

#### 7.4.2. Publicações em actas de congresso

- Viegas, C.; Sabino, R. & Veríssimo, C. (2013). Fungal contamination - Comparison between Portuguese Poultry and Swine. International Symposium on Occupational Safety and Hygiene, P429– 430.
- Viegas, C.; Sabino, R.; Viegas, S. & Veríssimo, C. (2013). Occupational exposure to toxigenic *Aspergillus versicolor* in Portuguese swine. International Symposium on Occupational Safety and Hygiene, P433 – 434.
- Viegas, S.; Carolino, E. & Viegas, C. (2013). Exposure to particles in Portuguese swine production. International Symposium on Occupational Safety and Hygiene, P433– 434.
- Viegas, S.; Veiga, L.; Figueredo, P.; Almeida, A.; Carolino, E. & Viegas, C. (2013). Occupational exposure to Aflatoxin B1 in Portuguese swine. International Symposium on Occupational Safety and Hygiene, P431– 432.
- Viegas, C.; Malta-Vacas, J. & Sabino, R. (2012). Molecular biology versus conventional methods – Complementary methodologies to understand occupational exposure to fungi. International Symposium on Occupational Safety and Hygiene, P478 – 479.
- Viegas, S.; Monteiro, A.; Manteigas, V.; Carolino, E. & Viegas, C. (2012). Influence of ventilation type in volatile organic compounds exposure – Poultry case, International Symposium on Occupational Safety and Hygiene, P481 – 482.
- Viegas, C.; Viegas, S.; Veríssimo, C. & Sabino, R. (2011). Ventilation influence in occupational exposure to fungi and volatile organic compounds – Poultry case. International Congress of Occupational and Environmental Health, que decorreu de 17 a 19 de Outubro de 2011 no Porto. pp. 86.
- Sabino, R.; Faisca, V.M.; Viegas, S.; Veríssimo, C. & Viegas, C. (2012). Possible respiratory infection due to *Aspergillus* in workers from swineries and poultry. Abstr. Nº 24, pp. 88, Advances Against Aspergilosis, Istanbul, Turquia, 25-29 janeiro 2012.

### 7.4.3. Publicações em livros

- Viegas, S.; Malta-Vacas, J.; Sabino, R.; Veríssimo, C. & Viegas, C. (2013). Potential poultry and meat products contamination by aflatoxin B1 due to fungal presence in Portuguese poultry units. *Environmental Health Risk VII*, 175 – 184. ISBN: 978-1-84564-704-9.
- Viegas, C.; Viegas, S.; Almeida-Silva, M.; Veríssimo, C. & Sabino, R. (2013). Environmental impact caused by fungal and particles contamination of Portuguese swine. *Environmental Health Risk VII*, 11 – 25. ISBN: 978-1-84564-704-9.
- Viegas, S.; Veiga, L.; Figueiredo, P.; Almeida, P.; Carolino, E. & Viegas, C. (2013). Occupational exposure to Aflatoxin B1 in Portuguese swine farms. *Occupational Safety and Hygiene*, 373 – 376. ISBN 978-1-138-00047-6.
- Viegas, C.; Viegas, S.; Carolino, E.; Sabino, R. & Veríssimo, C. (2013). Exposure to particles and fungi in Portuguese swine production. *Occupational Safety and Hygiene*, 377 – 381. ISBN 978-1-138-00047-6.
- Viegas, C.; Viegas, S.; Monteiro, A.; Carolino, E.; Sabino, R. & Veríssimo, C. (2012). Comparison of indoor and outdoor fungi and particles in poultry units *in Environmental Impact*, 62, 589 – 596. ISBN: 978-1-84564-604-2.
- Viegas, S.; Almeida-Silva, M. & Viegas, C. (2012). Exposure to dust in Poultry – The importance of task differences for detailed exposure assessment *in Air Pollution*, 297 - 306. ISBN: 978-1-84564-582-3.
- Viegas, C.; Viegas, S.; Monteiro, A.; Carolino, E.; Sabino, E. & Veríssimo, C. (2012). Air contaminants in animal production – poultry case *in Air Pollution*, 315 - 326. ISBN: 978-1-84564-582-3.

#### 7.4.4. Publicações em revistas científicas

- Viegas, C.; Malta-Vacas, J.; Sabino, R.; Viegas, S. & Veríssimo, C. Assessing indoor fungal contamination using conventional and molecular methods in Portuguese poultry. In press *Environmental Monitoring and Assessment*.
- Viegas, S.; Veiga, L.; Figueiredo, P.; Almeida, A.; Carolino, E.; Sabino, R.; Veríssimo, C. & Viegas, C. Occupational exposure to aflatoxin B1 in swine production and possible contamination sources. In press. *JTEH*.
- Viegas, S.; Mateus V.; Almeida-Silva, M.; Carolino, E. & Viegas, C. Occupational exposure to particulate matter and respiratory symptoms in Portuguese swine barn workers. In press. *JTEH*.
- Viegas, S.; Veiga, L.; Veríssimo, C.; Sabino, R.; Figueiredo, P.; Almeida, A.; Carolino, E. & Viegas, C. (2012). Occupational exposure to aflatoxin B1: the case of poultry and swine production. *World Mycotoxin Journal*. 249-255, 10.3920/WMJ2012.153.
- Viegas, C.; Carolino, E.; Sabino, R., Viegas, S.; Veríssimo, C. (2013). Fungal Contamination in Swine: A Potential Occupational Health Threat. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 76, 4-5, 272-280. <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2013.757205> 2013.
- Sabino, R.; Faísca, V.M.; Carolino, E.; Veríssimo, C. & Viegas, C. (2012). Occupational Exposure to *Aspergillus* by Swine and Poultry Farm Workers in Portugal. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 75, 1381–1391, [http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15287394.2012.721170?url\\_ver=Z39.88-2003&rft\\_id=ori:rid:crossref.org&rft\\_dat=cr\\_pub%3dpubmed](http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15287394.2012.721170?url_ver=Z39.88-2003&rft_id=ori:rid:crossref.org&rft_dat=cr_pub%3dpubmed)
- Viegas, C.; Carolino, E.; Malta-Vacas, J.; Sabino, R.; Viegas, S. & Veríssimo, C. (2012). Fungal contamination of poultry litter: a public health problem. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 75, 1341–1350, <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15287394.2012.721165>
- Malta-Vacas, J.; Sabino, R.; Viegas, S. & Viegas, C. (2012). Occupational Exposure to toxigenic fungi from *Aspergillus flavus* complex. *Toxicology Letters*. 211S, S43-S216. P34-04
- Viegas, S.; Sabino, R.; Veríssimo, C.; Monteiro, A. & Viegas, C. (2012). Fungi, MVOCs and dust exposure assessment in Poultry production. *Mycoses*. 55; 4: P727. <http://onlinelibrary.wiley.com/advanced/search/results>.
- Faísca, V.; Carolino, E.; Sabino, R.; Veríssimo, V. & Viegas, C. (2012). Effects of fungal contamination respiratory symptoms of poultry workers. *Mycoses*. 55; 4: P731. <http://onlinelibrary.wiley.com/advanced/search/results>
- Viegas, C.; Viegas, S.; Veríssimo, C.; Rosado, L. & Silva-Santos, C. (2011). Possíveis implicações da contaminação fúngica num aviário. *Saúde & Tecnologia*, 6, 17 – 23.
- Malta-Vacas, J.; Sabino, R.; Brito, M. & Viegas, C. (2011). Identificação molecular de *Aspergillus fumigatus* em amostras de ar interior. *Saúde & Tecnologia*. Suplemento. P180. ISSN: 1646-9704.
- Viegas, S.; Faísca, V.M.; Dias, H.; Clérigo, A.; Carolino, E. & Viegas, C. Occupational exposure to poultry dust and effects on the respiratory system in workers. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. Aceite para publicação.

#### 7.4.5. Posters científicos

- Viegas, C.; Viegas, S.; Malta-Vacas, J.; Sabino, R. & Veríssimo, C.(2013). Fungal contamination caused by *Aspergillus fumigatus* in portuguese poultries. 2<sup>nd</sup> Ibero-American Meeting on Toxicology and Environmental Health (IBAMTOX) apresentado em Ribeirão Preto, Brasil, 17 – 19 junho de 2013.
- Viegas, S.; Faisca, V.M.; Almeida-Silva, M. ; Carolino, E. & Viegas, C. (2013). Occupational exposure to particle matter and respiratory symptoms in Portuguese swine. 2nd Ibero-American Meeting on Toxicology and Environmental Health (IBAMTOX) apresentado em Ribeirão Preto, Brasil, 17 – 19 junho de 2013.
- Viegas, S.; Sabino, R.; Veríssimo, C.; Martins, C.; Alvito, P. & Viegas, C. (2012). Ochratoxin A presence in poultry settings – A public health problem? ESTIV 2012, Lisboa (ESTeSL), 16 a 19 de Outubro.
- Malta-Vacas, J.; Sabino, R.; Viegas, S. & Viegas, C. (2012). Occupational Exposure to toxigenic fungi from *Aspergillus flavus* complex. Eurotox.
- Viegas, S.; Veiga, L.; Almeida, A.; Carolino, E. & Viegas, C. (2012). Biological monitoring of aflatoxin (AFB1) in workers of swine and poultry production. Eurotox.
- Viegas, S.; Sabino, R.; Veríssimo, C.; Monteiro, A. & Viegas, C. (2012). Fungi, MVOCs and dust exposure assessment in Poultry production. ISHAM P727.
- Faisca, V.; Carolino, E.; Sabino, R.; Veríssimo, C. & Viegas, C. (2012). Effects of fungal contamination respiratory symptoms of poultry workers. ISHAM P731.
- Almeida-Silva, M.; Viegas S.; & Viegas, C. (2012). Poultry Litter Re-use: Environmental Problem in Portugal? ICEH.
- Nunes, A.C.; Domingues, A.; Malta-Vacas, J. & Viegas, C. (2012). Fast-growing fungi: a problem to be solve to achieve the characterization of occupational exposure to fungi in cork industry. ICEH.
- Dias, H.; Clérigo, A.; Carolino, E. & Viegas, C. (2012). Evaluation of lung function abnormalities prevalence in poultry workers.ICEH.
- Sabino, R.; Veríssimo, C. & Viegas, C. (2012). Ocupacional exposure to *Scopulariopsis* sp. in poultry and swinneries' workers. ICEH.
- Dias, H.; Clérigo, A.; Carolino, E. & Viegas, C. (2012). Evaluation of lung function abnormalities prevalence in poultry workers. ICEH.
- Veríssimo, C.; Parada, H.; Barreiro, P.; Alvim, M.; Almeida, A.; Sabino, R.; Carolino, E. & Viegas, C. (2012). Poultry workers fungal exposure and sensitization. ICEH.
- Sabino, R.; Mateus, V.; Viegas, S.; Veríssimo, C. & Viegas, C. (2012). Possible respiratory infection due to *Aspergillus* in workers from swineries and poultries. Abstr. N° 24, pp. 88, Advances Against Aspergilosis, Istambul, Turquia, 25-29 janeiro 2012.
- Viegas, S.; Viegas, C.; Sabino, R. & Veríssimo, C. (2012). Possible aflatoxin presence in Portuguese poultry units. Abstr. N° 25, pp. 89, Advances Against Aspergilosis, Istambul, Turquia, 25-29 janeiro 2012.

- Viegas, C.; Viegas, S.; Veríssimo, C. & Sabino, R. (2011). Ventilation influence in occupational exposure to fungi and volatile organic compounds – Poultry case. International Congress of Occupational and Environmental Health, que decorreu de 17 a 19 de Outubro de 2011 no Porto.
- Malta-Vacas, J.; Sabino, R.; Brito, M. & Viegas, C. (2011). Identificação molecular de *Aspergillus fumigatus* em amostras de ar interior. VI Encontro Nacional das Ciências e Tecnologias da Saúde”, organizado pela ESTeSL - IPL a decorrer nos dias 20, 21 e 22 de Outubro de 2011.
- Viegas, C.; Viegas, S.; Sabino r, veríssimo C: Ventilation influence in occupational exposure to fungi and volatile organic compounds – Poultry case. International Conference on Occupational and Environmental Health que decorreu de 17 a 19 de Outubro no Porto em 2011. P17.
- Viegas, S.; Faísca, V.M.; Carolino & Viegas, C. (2012). Occupational exposure to poultry dust and the relation with respiratory symptoms. ICEH 2012.